

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

AU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR

DOMINIQUE ST-ONGE

ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE L'ACTINE

ET LES LIPIDES MEMBRANAIRES

JANVIER 1990

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## Résumé

L'actine est une protéine que l'on retrouve dans la plupart des cellules eucaryotes où elle joue deux rôles principaux:

- elle a un rôle dynamique, en étant impliquée dans plusieurs phénomènes de motilité comme la phagocytose, la cytodierèse, le déplacement d'organites, etc...
- elle a un rôle statique puisque, en collaboration avec les microtubules et les filaments intermédiaires, elle compose le cytosquelette qui maintient la forme de la cellule

Pour exercer ces deux fonctions, l'actine doit être liée aux membranes. Le concept actuel est que l'actine est attachée aux membranes par l'intermédiaire d'autres protéines soit périphériques, comme la spectrine chez le globule rouge, soit intégrale comme la ponticuline identifiée chez *Dictyostelium*. Par contre, il est rarement fait mention dans la littérature que l'actine puisse être liée directement aux lipides des membranes.

Au cours de ce projet de recherche, nous avons montré qu'il existe aussi une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires.

Nous avons, tout d'abord, visualisé l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires par microscopie électronique. L'actine forme des structures paracristallines en se disposant de façon régulière à la surface de membranes artificielles: les liposomes. Cette interaction ne se produit qu'en présence de concentrations millimolaires de cations divalents. Ces filaments d'actine se disposent parallèlement et/ou s'entrecroisent de manière régulière à la surface des liposomes.

Nous avons ensuite quantifié l'interaction entre l'actine et les lipides par turbidimétrie et cosédimentation. Ces techniques ont mis en évidence la formations d'agrégats entre l'actine et les liposomes. Cette agrégation entre l'actine et les liposomes est maximale en présence de 10 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ . Ces expériences suggèrent qu'il s'agit là d'une interaction de type électrostatique.

Les mesures de perméabilité des liposomes à la carboxyfluorescéine montrent qu'il existe une interaction entre l'actine et les lipides en présence, mais aussi en absence, de cations divalents. En absence de cations divalents, cette interaction serait de nature hydrophobe.

Des mesures de polarisation de fluorescence montrent qu'en présence de cations divalents l'interaction actine-liposomes produit une diminution de la fluidité des lipides. Par contre, cette perturbation ne se produit pas en absence de cations divalents.

Finalement, l'analyse des spectres de fluorescence intrinsèque de l'actine montre que l'interaction actine-lipides n'entraîne pas de changement conformationnel de l'actine.

L'ensemble des résultats nous permet de conclure qu'il existe une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires et que cette interaction serait de deux types: une interaction de type hydrophobe et une interaction de nature électrostatique favorisée par la présence de cations divalents. Lors de cette interaction l'actine ne subit pas de modification conformationnelle mais, par contre, la membrane des liposomes devient plus fluide.

## **Remerciements**

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui m'ont aidé pendant mes études graduées par leurs commentaires et leurs discussions toujours enrichissants.

Je remercie plus particulièrement le D<sup>r</sup> Claude Gicquaud, mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de faire ces études.

Je remercie aussi le Fonds F.C.A.R. pour son soutien financier.

## TABLE DES MATIERES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des abréviations.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xvii
Introduction.....	1
I. Description de l'actine et de ses propriétés physico-chimiques.....	1
A) Structure de l'actine monomérique (actine-G).....	2
B) Structure de l'actine filamenteuse (actine-F).....	3
C) Structure des paracristaux d'actine.....	6
II. Interaction actine-membranes naturelles.....	7
III. Composition des membranes naturelles.....	13
IV. Description des liposomes.....	15
V. Objectif du projet de recherche.....	21

Matériel et méthodes.....	24
I. Liste des produits chimiques.....	24
II. Préparation des solutions.....	25
A) Solutions tampons.....	25
B) Autres solutions.....	26
III. Préparation des liposomes.....	26
A) Liposomes unilamellaires de petite taille.....	26
B) Liposomes unilamellaires de grande taille.....	27
IV. Préparation de l'actine.....	28
V. Techniques de mesure de l'interaction entre l'actine et les liposomes.....	29
A) Mesure par turbidimétrie et cosédimentation.....	29
Principe de la turbidimétrie.....	29
Principe de la cosédimentation.....	30
Protocoles expérimentaux pour les techniques de turbidimétrie et de cosédimentation.....	31
1) Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes (SUV).....	31
2) Influence des cations divalents sur l'interaction actine-liposomes (SUV).....	31
3) Influence des cations divalents sur les liposomes (SUV) seuls et l'actine seule.....	32

B) Mesure de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine (CF).....	32
Principe de la méthode.....	32
Protocoles expérimentaux pour l'étude de la perméabilité des liposomes (SUV).....	33
1) Influence de la concentration d'actine sur la perméabilité des liposomes.....	33
2) Influence des cations divalents sur la perméabilité des liposomes.....	34
3) Influence de l'actine et des cations divalents sur la CF seule.....	34
C) Mesure de la fluidité des bicouches lipidiques (SUV) par polarisation de fluorescence de la sonde 1,6-diphényl-,3,5-hexatriène (DPH).....	35
Principe de la méthode.....	35
Protocoles expérimentaux pour l'étude de la fluidité des liposomes(SUV).....	36
1) Influence de la concentration d'actine sur la fluidité de la bicouche lipidique.....	36
2) Influence des cations divalents sur la fluidité de la bicouche lipidique.....	36
3) Influence de l'actine seule sur la sonde DPH.....	37
4) Calcul du degré de polarisation de la sonde DPH.....	37
D) Mesure de la fluorescence intrinsèque de l'actine.....	38
Principe de la méthode.....	38



Protocole expérimental pour la mesure de la fluorescence intrinsèque de l'actine.....	39
E) Microscopie électronique à transmission.....	40
Résultats.....	41
I. Mise en évidence de l'interaction entre l'actine et les liposomes (SUV) par turbidimétrie et cosédimentation.....	41
A) Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes en absence de cations divalents.....	42
1) interaction entre l'actine-G et les liposomes en absence de cations divalents.....	42
2) interaction entre l'actine-F et les liposomes en absence de cations divalents.....	45
B) Influence des cations divalents sur l'interaction actine-liposomes.....	48
1) interaction entre l'actine-G et les liposomes en présence de cations divalents.....	48
influence des ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	48
influence des ions $\text{Mg}^{2+}$ .....	61
2) interaction entre l'actine-F et les liposomes en présence de cations divalents.....	66
influence des ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	66
influence des ions $\text{Mg}^{2+}$ .....	73
3) interprétation des résultats.....	90

II- Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine.....	92
A) Influence de la concentration d'actine sur la perméabilité des liposomes en absence de cations divalents.....	93
1) interaction entre l'actine-G et les liposomes en absence de cations divalents.....	93
2) interaction entre l'actine-F et les liposomes en absence de cations divalents.....	98
3) interprétation des résultats.....	98
B) Influence des ions divalents $\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ sur l'interaction actine-liposomes par mesure de la perméabilité des liposomes à la CF.....	101
1) interaction entre l'actine-G et les liposomes en présence de cations divalents.....	101
2) interaction entre l'actine-F et les liposomes en présence de cations divalents.....	106
III- Etude de la fluidité des membranes des liposomes par mesure de la polarisation de fluorescence du DPH.....	115
A) Influence de la concentration d'actine sur la fluidité des liposomes en absence de cations divalents.....	115
B) Influence des ions divalents $\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ sur l'interaction actine-liposomes mesurée par polarisation de la sonde DPH.....	120
1) influence des cations divalents sur les liposomes seuls.....	120
2) interaction entre l'actine-G et les liposomes.....	123
3) interaction entre l'actine-F et les liposomes.....	128

IV- Etude de l'interaction actine-liposomes par observation des spectres de fluorescence intrinsèque de l'actine.....	134
1) fluorescence intrinsèque de l'actine-G en présence de liposomes.....	134
2) fluorescence intrinsèque de l'actine-F en présence de liposomes.....	135
 V- Mise en évidence de l'interaction actine-liposomes par microscopie électronique à transmission.....	141
 Conclusion.....	171
 Discussion.....	172
 Bibliographie.....	194

## LISTE DES ABREVIATIONS

PC = phosphatidylcholine

PG = phosphatidylglycérol

PI = phosphatidylinositol

PS = phosphatidylsérine

AO = acide oléique

CH = cholestérol

CF = 5(6),carboxyfluorescéine

DPH = 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène

SUV = liposome unilamellaire de petite taille

LUV = liposome unilamellaire de grande taille

MLV = liposome multilamellaire

## Liste des figures

Figures	Page
1. Schéma d'un monomère d'actine montrant le grand et le petit domaine.....	2
2. Schéma d'un filament d'actine.....	4
3. Schéma du processus de polymérisation de l'actine.....	5
4. Modèle de la liaison de l'actine à la membrane de l'épithélium des bordures des brosses de l'intestin.....	9
5. Arrangement du complexe actine-spectrine-ankyrine-bande 3 dans le globule rouge.....	11
6. Schéma d'une membrane plasmique.....	14
7. Schéma de différents lipides disposés en bicouche.....	16
8. Schéma d'un liposome unilamellaire.....	17
9. Structure des lipides utilisés dans notre recherche.....	19
10. Turbidité des mélanges actine-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'actine-G, en absence de cations divalents.....	43
11. Turbidité des mélanges actine-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'actine-F, en absence de cations divalents.....	46
12. Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	49
13. Turbidité de l'actine-G seule en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	52

14. Turbidité des liposomes seuls en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	54
15. Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	56
16. Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	59
17. Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions $\text{Mg}^{2+}$ .....	62
18. Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions $\text{Mg}^{2+}$ .....	64
19. Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'ions $\text{Mg}^{2+}$ .....	67
20. Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	69
21. Turbidité de l'actine-F seule en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	71
22. Turbidité des liposomes seuls en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	74
23. Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	76
24. Turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'ions $\text{Ca}^{2+}$ .....	78
25. Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions $\text{Mg}^{2+}$ .....	81

26. Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions $Mg^{2+}$ .....	83
27. Turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'ions $Mg^{2+}$ .....	85
28. Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'ions $Mg^{2+}$ .....	87
29. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine, en fonction du temps, en absence d'actine.....	94
30. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine, en fonction de la concentration d'actine-G, en absence de cations divalents.....	96
31. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine en fonction de la concentration d'actine-F en absence de cations divalents.....	99
32. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine en fonction de la concentration d'ions $Ca^{2+}$ en présence d'actine-G .....	102
33. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine en fonction de la concentration d'ions $Mg^{2+}$ en présence d'actine-G .....	104
34. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine en fonction de la concentration d'ions $Ca^{2+}$ en présence d'actine-F.....	102
35. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine en fonction de la concentration d'ions $Mg^{2+}$ en présence d'actine-F .....	102

36. Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine en fonction de la concentration d'ions $Mg^{2+}$ en absence d'actine.....	112
37. Influence de la concentration d'actine-G sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence.....	116
38. Influence de la concentration d'actine-F sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence.....	118
39. Influence des ions $Mg^{2+}$ sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence, en absence d'actine.....	121
40. Influence des ions $Ca^{2+}$ sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence, en présence d'actine-G.....	124
41. Influence des ions $Mg^{2+}$ sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence, en présence d'actine-G.....	126
42. Influence des ions $Ca^{2+}$ sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence, en présence d'actine-F.....	129
43. Influence des ions $Mg^{2+}$ sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence, en présence d'actine-F.....	131
44. Agrégat d'actine et de petits liposomes (SUV) en présence de 20 mM de cations divalents.....	147
45. Arrangement en "chainettes" de petits liposomes (SUV) à l'intérieur d'un paracristal d'actine.....	149



46. Amas d'actine et de petits liposomes (SUV), les liposomes sont agrégés le long d'un paracristal d'actine.....	151
47. Amas de petits liposomes (SUV) à proximité de l'actine.....	153
48. Aucune évidence d'interaction entre l'actine et les liposomes de grande taille en absence de cations divalents.....	155
49. Deux liposomes (LUV) réunis par des filaments d'actine.....	157
50. Arrangement régulier des filaments d'actine à la surface d'un liposome (LUV).....	159
51. Des filaments d'actine disposés parallèlement sur deux liposomes de grande dimension.....	161
52. Liposome (LUV) recouvert de filaments d'actine disposés les uns parallèles aux autres.....	163
53. Filaments d'actine disposés en "filet" à la surface d'un liposome de grande taille.....	165
54. Filaments d'actine organisés parallèlement et en "filet" sur un même liposome de grande dimension.....	167
55. Filaments d'actine organisés de façon parallèle sur un liposome et en "filet" sur un autre.....	169
56. Schéma des trois types d'interaction protéine-lipides.....	187

## Liste des tableaux

Tableau	Page
1. Principales protéines impliquées dans la liaison actine-membranes.....	12
2. Pourcentage de quelques lipides présents dans les membranes naturelles.....	20
3. Longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-G en présence de liposomes de différentes compositions.....	137
4. Longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-G seule.....	138
5. Longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-F en présence de liposomes de différentes compositions.....	139
6. Longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-F seule.....	140

## Introduction

Vers le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, Straub a isolé une protéine du muscle squelettique, qu'il a nommée actine et dont il a caractérisé les principales propriétés (108). Une décennie plus tard, on a reconnu que l'actine est l'une des protéines responsables de la contraction musculaire. Les premières études sur l'actine n'avaient porté que sur la cellule du muscle strié. Par la suite, on a observé la présence d'actine dans plusieurs types de cellules autres que les cellules musculaires. Dans ces cellules non-musculaires, l'actine est impliquée dans des phénomènes de motilité et joue aussi un rôle de constituant du cytosquelette qui maintient la forme et la structure générale des cellules. Depuis le début des années 80, les recherches sur l'actine et ses propriétés se sont intensifiées et ont été focalisées sur l'étude des paramètres fondamentaux du processus de sa polymérisation ainsi que sur les protéines se liant à l'actine.

### I. Description de l'actine et de ses propriétés physico-chimiques

L'actine est une protéine que l'on retrouve dans la plupart des cellules eucaryotes. Selon son origine, l'actine diffère très peu d'une espèce à l'autre. Il existe parfois de légères différences au niveau du poids moléculaire ou du point isoélectrique, mais malgré ces différences, l'actine conserve ses principales propriétés.

### A) Structure de l'actine monomérique (actine-G)

Les études, en microscopie électronique et reconstitutions structurales de feuilletts cristallins d'actine pure (140-141) montrent que le monomère d'actine est constitué d'un grand et d'un petit domaine (Voir figure 1) (124).

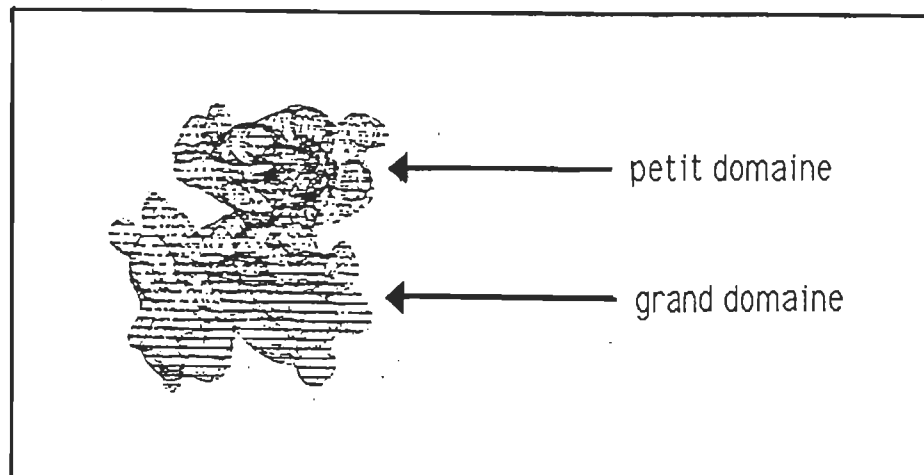


Figure1. Schéma d'un monomère d'actine montrant le grand et le petit domaine. (124).

Le monomère d'actine comprend environ 375 acides aminés dont 40% composent le petit domaine où se situe l'extrémité  $\text{NH}_2$ -terminale et 60% font partie du grand domaine où se trouve l'extrémité C-terminale.

Les dimensions d'un monomère d'actine sont de 3.3 X 5.6 X 5.0 nm. Son poids moléculaire est d'environ 42000 daltons.

Chaque monomère d'actine possède un site spécifique pour un ion  $\text{Ca}^{2+}$  (7, 93) et un site pour les nucléotides, habituellement l'ATP (7, 146, 169). De

plus, il existe sur chaque monomère d'actine deux classes de sites pour les cations divalents: des sites de haute affinité, et des sites de faible affinité.

Le point isoélectrique de l'actine est aux environs de pH 5.0. L'actine monomérique possède donc une charge globale négative à pH 8.0 (79, 165), pH auquel on utilise généralement l'actine.

### B) Structure de l'actine filamenteuse (actine-F)

Lorsque les sites de haute affinité sont saturés par des cations, la polymérisation se produit, alors les monomères d'actine s'arrangent en une structure hélicoïdale formée de deux brins torsadés (Voir figure 2). Le pas de l'hélice est de 37.5 nm. Chaque période comprend 13 monomères distancés de 5.5 nm. Le diamètre d'un filament d'actine est d'environ 7 nm.

L'association des monomères d'actine en filament est un phénomène de polymérisation (114). Cette polymérisation de l'actine se fait en deux étapes (159). La première étape est celle de la nucléation. Elle consiste en la formation d'un noyau constitué par 3 ou 4 monomères. La deuxième étape est le processus d'élongation. Lors de ce processus, les monomères d'actine s'ajoutent aux deux extrémités du noyau. Comme l'affinité des monomères est différente pour chaque extrémité, la polymérisation est plus rapide à une extrémité qu'à l'autre.

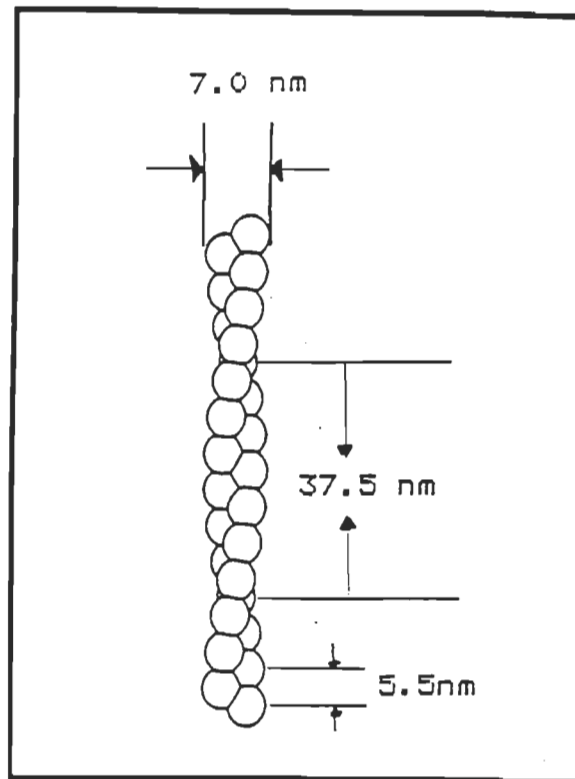


Figure 2. Schéma d'un filament d'actine (40).

A l'état d'équilibre, les filaments ne demeurent pas dans un état statique: une extrémité du filament continue à polymériser tandis que l'autre extrémité se dépolymérise à la même vitesse. Ce phénomène, appelé "treadmilling", permet un échange entre les monomères d'actine du filament et ceux du milieu (109-171).

Il est à noter que la polymérisation de l'actine est toujours induite par des cations (62, 94, 134). En conséquence, on admet que la neutralisation des charges négatives de l'actine permet la polymérisation (3, 5, 129, 148). Les cations les plus couramment utilisés pour polymériser l'actine sont les ions  $K^+$  (64) à une concentration située aux environs de la centaine de millimolaire, les ions  $Mg^{2+}$  (54, 95, 129) ou  $Ca^{2+}$  (63-153) à une concentra-

tion de l'ordre du millimolaire (96). Les cations divalents sont donc plus efficaces que les cations monovalents pour induire la polymérisation de l'actine. En général, on polymérise l'actine *in vitro* par ajout de 100mM d'ions  $K^+$  plus 1 mM d'ions  $Mg^{2+}$ .

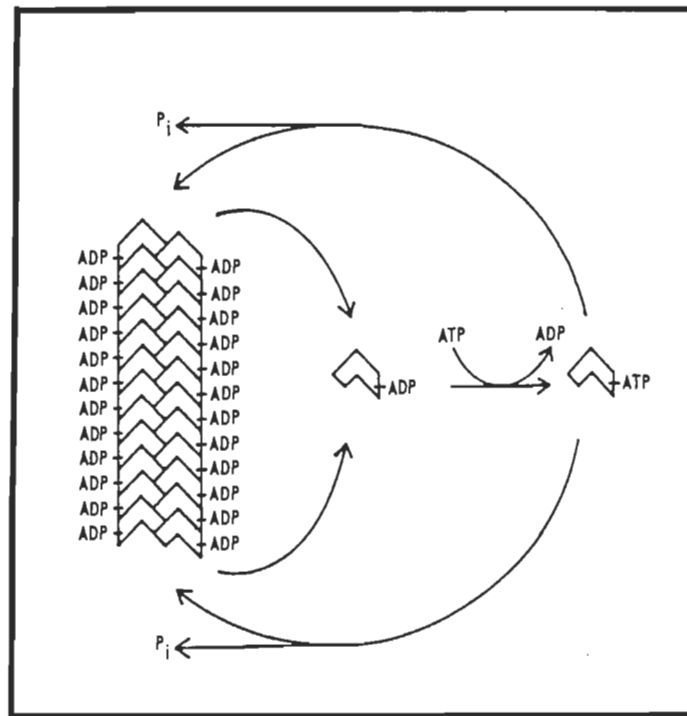


Figure 3. Schéma du processus de polymérisation de l'actine selon Wegner (171).

Les filaments d'actine formés dans ces conditions standard de polymérisation ne s'associent pas entre eux et sont dispersés uniformément dans la solution.

### C) Structure des paracristaux d'actine

Dans certaines conditions, les filaments d'actine peuvent s'assembler et former des structures régulières appelées paracristaux. Ces structures sont obtenues de plusieurs façons soit, par de fortes concentrations d'ions  $Mg^{2+}$ , environ 25 mM (68, 148) ou d'ions lanthanides (8-9), en particulier le gadolinium (42). On peut aussi former des paracristaux en mettant l'actine en présence de 0.1-0.2 M KCl, 0.4 mM ATP, au point isoélectrique (pI) de l'actine (79).

Selon les conditions expérimentales, différents types de paracristaux peuvent être obtenus:

- 1- Les paracristaux de Hanson
- 2- Les paracristaux de Kawamura
- 3- Les microcristaux de Dos Remedios

1- Les paracristaux de Hanson (68) sont formés de filaments d'actine, disposés en phase, parallèlement les uns aux autres. Ces paracristaux ont donc une périodicité de 37.5 nm qui correspond à celle du filament d'actine. Ils sont obtenus en présence d'un excès de cations divalents, généralement le  $Mg^{2+}$ .

2- Les paracristaux de Kawamura (79) sont de 3 types nommés type I, II et III. Les types I et II sont formés par des filaments d'actine entrecroisés en "filet", tandis que le type III est morphologiquement semblable aux



paracristaux de Hanson. Ces paracristaux de Kawamura sont obtenus en incubant l'actine à un pH équivalent à son pI.

3- Les microscristaux de Dos Remedios et coll. (8, 9, 42) sont constitués par l'accolement latéral et régulier de monomères d'actine disposés en monocouche. Ils sont obtenus par la présence d'ions lanthanides.

Il faut souligner que les conditions dans lesquelles sont formés ces paracristaux sont très différentes de celles qui existent *in vivo*. On a cependant retrouvé, dans des cellules, des structures paracristallines formées d'actine mais associées à d'autres protéines (24, 40, 77, 138).

## II. Interaction actine-membranes naturelles

Il est maintenant admis que l'actine est un constituant aussi bien des cellules musculaires que des cellules non-musculaires comme par exemple les cellules sanguines: globules rouges (20, 30, 46, 67, 157), neutrophiles (6), lymphocytes (17), des cellules de plusieurs organes: oeil (13, 18, 39, 73, 80, 130), foie (100, 111), intestin (56, 98, 106) de même que dans les cellules cancéreuses (14, 60, 66, 138), les amibes (33, 47, 76, 125, 143, 172, 177) les oeufs d'oursin (78, 90, 104, 154), les spermatozoïdes (52, 156) et les cellules végétales (1, 19, 34, 36, 85, 118, 119, 122) etc...

L'actine a deux fonctions principales:

1) l'actine contribue à plusieurs phénomènes motiles. Citons par exemple

le mouvement d'une cellule par formation de pseudopodes (35, 47, 152, 177), la cytodierèse (51, 69, 133). On note la présence d'actine associée au déplacement d'organites comme entre autres, les lysosomes dans les cellules leucocytaires (103), les granules des cellules chromaffines (21, 23) et des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine de grenouille (107). L'actine joue aussi un rôle dans la régulation de la filtration glomérulaire (2), la transmission synaptique (25), la diffusion latérale des molécules de photorécepteurs (38), et bien entendu, la contraction musculaire (147, 176).

2) l'actine est aussi un constituant important du cytosquelette. C'est le cytosquelette qui maintient la forme et la structure générale des cellules. Deux exemples de cytosquelette ont été très étudiés:

- le cytosquelette du globule rouge (65, 117, 135) où, en interaction avec d'autres protéines, l'actine forme un réseau attaché à la membrane qui maintient la forme biconcave des globules rouges (Voir figure 5).

- le cytosquelette de la bordure en brosse des cellules de l'épithélium intestinal (105). Les microvillosités de cet épithélium, qui composent la bordure en brosse, sont maintenues par des faisceaux de filaments d'actine disposés parallèlement les uns aux autres (Voir figure 4).

L'actine ne joue pas un rôle de composant du cytosquelette seulement dans ces deux types de cellules. D'autres exemples sont bien connus: cellules de la cornée (39), fibroblastes (65, 77), plaquettes sanguines (56, 128, 151), cellules cancéreuses (16, 175), neutrophiles (17) et cellules pulmonaires (161), etc...

Que ce soit au cours de sa participation à des phénomènes motiles, ou en tant qu'élément du cytosquelette, l'actine filamentueuse est souvent attachée aux membranes (15, 28, 65, 66, 72, 98, 101, 125, 151, 156, 160). Par exemple, dans les microvillosités de l'épithélium intestinal (Voir figure 4), l'actine organisée en faisceaux est liée à la membrane plasmique de deux façons:

1) de façon latérale: les faisceaux d'actine disposés parallèlement à la membrane sont reliés à celle-ci par une autre protéine qui serait le complexe 110 kDa-calmoduline (21, 32, 59, 71).

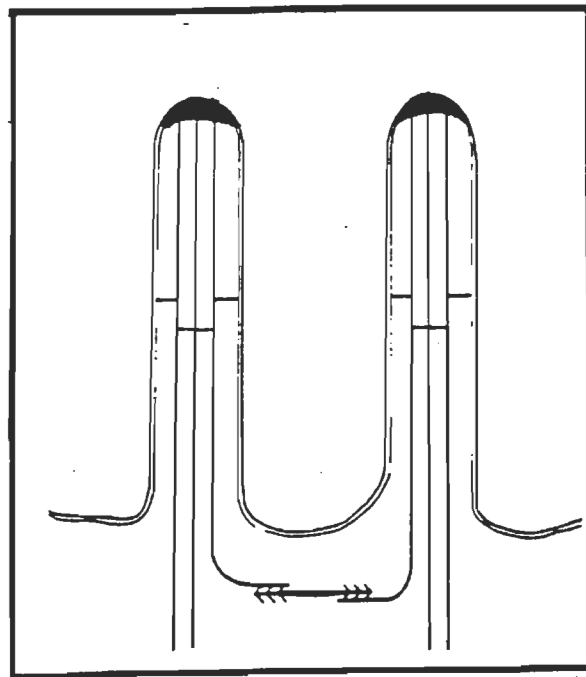


Figure 4: Modèle de la liaison de l'actine à la membrane de l'épithélium intestinal des bordures en brosse de l'intestin (105).

2) de façon perpendiculaire: une extrémité des faisceaux d'actine est attachée à la membrane par d'autres protéines qui forment la plaque dense.

Dans le cas des microvillosités de l'épithélium intestinal, l'actine filamenteuse est attachée à la membrane de deux façons: latéralement et perpendiculairement, mais dans certains cas, l'actine est liée à la membrane uniquement de manière latérale (70, 88, 118) ou uniquement de façon perpendiculaire (10, 139, 155, 158).

Les nombreuses études portant sur l'interaction actine-membranes montrent que la liaison de l'actine aux membranes ne se fait pas directement entre l'actine et les lipides mais plutôt par l'intermédiaire d'une ou de plusieurs autres protéines (20, 22, 29, 31, 37, 53, 57, 75, 83, 84, 89, 92, 99, 102, 123, 127, 160). Ainsi, dans le cytosquelette du globule rouge, l'actine est attachée à la membrane cytoplasmique par un complexe spectrine-ankyrine-bande 3 (Voir figure 5).

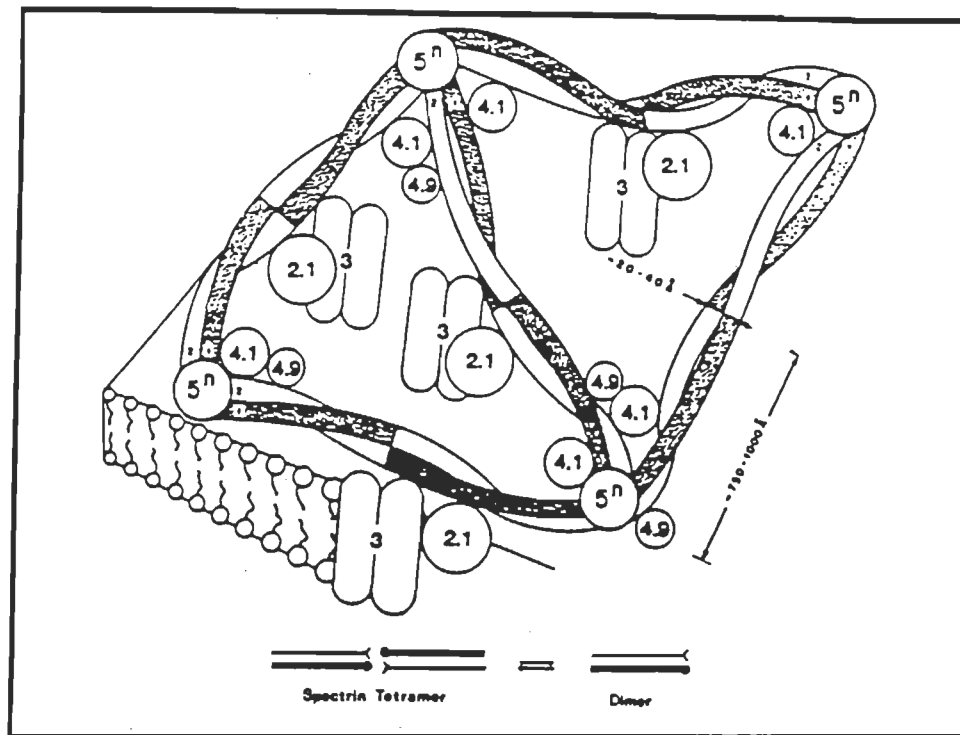


Figure 5: Arrangement du complexe actine-spectrine-ankyrine-bande 3 dans le globule rouge (135).

5<sup>n</sup> : actine-G

2.1 : ankyrine

3 : bande 3

— : spectrine

Ceci n'est qu'un exemple, car comme on peut le voir au tableau I, un grand nombre de protéines liant l'actine aux membranes ont été identifiées et ce, dans divers types de cellules.

<u>Nom de la protéine</u>	<u>Source</u>	<u>Poids moléculaire</u>
110-kD	Bordure en brosse de l'épithélium intestinal	110,000
Vinculine	Muscle lisse	130,000
	Muscle strié	130,000
	Plaquettes sanguines	130,000
	Fibroblastes	130,000
Métavinculine	Muscle lisse	150,000
Taline	Muscle lisse	215,000
24-kD	<i>Dictyostelium</i>	24,000
Protéine I (85-kD)	Bordure en brosse de l'épithélium intestinal	2 X 36,000
GP IIb-III	Plaquettes sanguines	155,000
		114,000
GP Ib	Plaquettes sanguines	165,000
58-kD/CAG	Adénocarcinome	58,000
		75,000
140-kD	Fibroblaste	140,000
130-kD	Fibroblaste	130,000
	Muscle	130,000
Spectrine	Plusieurs tissus de mammifères	265 X 2
		260 X 2
Bande 4.1 (Synapsine)	Plusieurs tissus de mammifères	75-80,000

Tableau I : Tableau des principales protéines impliquées dans la liaison actine-membranes (124).

Certaines de ces protéines d'ancrage de l'actine agissent seule pour établir la liaison actine-membrane. C'est le cas notamment de l' $\alpha$ -actinine, présente dans les cellules intestinales (105, 132) ainsi que de la protéine 43 kD isolée du poisson *Torpedo marmorata* (170). Par contre, plusieurs autres protéines d'ancrage s'associent à une ou plusieurs autres protéines intégrales ou périphériques. C'est le cas du complexe 110 kD-calmoduline situé dans les microvillosités intestinales (21, 32, 59, 71), ainsi que le complexe taline-métavinculine-vinculine mis en évidence dans les fibroblastes (92).

Les récents travaux effectués dans le domaine de l'interaction actine-membranes ont surtout mis en évidence l'existence de protéines qui lient l'actine globulaire ou filamenteuse aux membranes. Comme nous venons de le voir, plusieurs de ces protéines ont été isolées et caractérisées et, le mécanisme suivant lequel ces protéines attachent l'actine aux membranes est généralement bien connu. Par contre, on a très rarement fait état de la possibilité d'une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires.

### III. Composition des membranes naturelles

Les membranes cellulaires sont composées principalement de lipides et de protéines. Le modèle membranaire suggéré par Danielli et Davson en 1955 (174) consiste en une bicouche lipidique où les lipides sont orientés avec leurs groupes hydrophiles vers l'extérieur de la bicouche et leurs chaînes

hydrophobes vers l'intérieur. Les protéines membranaires sont, soit périphériques c'est à dire adsorbées à la surface des lipides, soit intégrales c'est à dire qu'elles baignent dans la matrice lipidique (Voir figure 6).

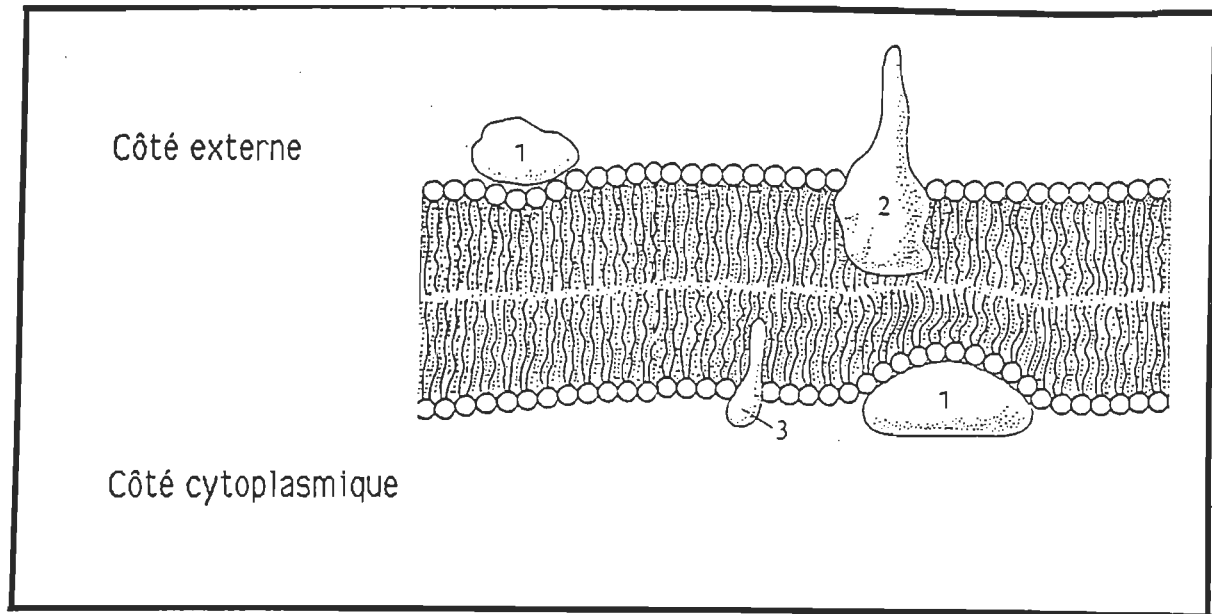


Figure 6: Schéma d'une membrane plasmique montrant les lipides ainsi que les protéines périphériques (1) et intégrales (2-3) (174).

Le rapport protéines-lipides est variable d'une membrane à l'autre. Généralement dans les membranes naturelles, les protéines sont en quantité égale ou excèdent la quantité de lipides en poids. Les protéines sont donc une composante importante de la membrane.

Plusieurs chercheurs ont étudié l'interaction entre l'actine et les membranes d'organites comme les lysosomes (103), les granules chromaffines (101), et des cellules telles: les lymphocytes (13), les cellules



cancéreuses Hela et 3T3 (66). Différentes approches ont été utilisées pour mettre en évidence l'interaction entre l'actine et les membranes naturelles. Tout d'abord, des analyses biochimiques ont permis d'isoler de l'actine des membranes naturelles purifiées (37, 38, 66, 164). Des observations en microscopie optique et électronique (101, 103, 118, 155), ont montré la présence d'actine à proximité des membranes naturelles. De plus, des recherches ont montré que l'actine purifiée s'attache aux membranes naturelles (61, 72, 115, 116). De ces travaux, il ressort qu'il existe une interaction entre l'actine et ces membranes naturelles mais on n'a jamais pu préciser si l'actine se lie aux lipides ou aux protéines intrinsèques de ces membranes.

Pour aborder ce problème, nous nous proposons d'utiliser des membranes artificielles composées exclusivement de lipides. En 1965, Bangham (4) a réussi à fabriquer des membranes artificielles qu'il a appelées liposomes. Il a obtenu des liposomes en ajoutant à des lipides un excès de phase aqueuse. Les liposomes ont certaines des propriétés des membranes naturelles, mais ils ne sont composés que de lipides, ce qui en fait un système de choix pour les études d'interaction protéines-lipides.

#### IV- Description des liposomes

L'unité de base d'un liposome est le lipide. Un lipide est une molécule amphiphile comprenant une tête polaire hydrophile et une ou deux chaînes d'acide gras hydrophobes (Voir figure 7).

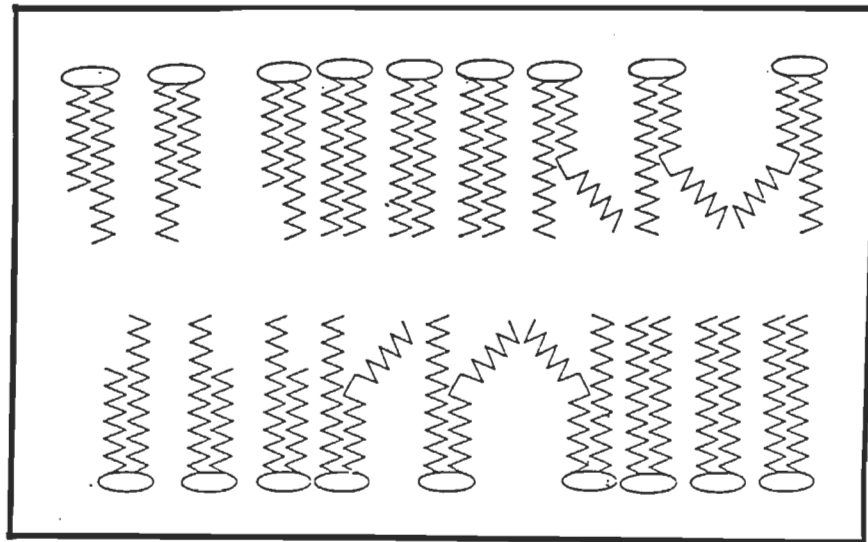


Figure 7: Schéma de différents lipides disposés en bicouche (174).

En milieu aqueux, les lipides se disposent de façon particulière. Les chaînes d'acides gras hydrophobes se placent les unes en face des autres et les têtes hydrophiles sont en contact avec la phase aqueuse. Il se forme une structure en bicouche fermée nommée liposome (Voir figure 8).

On distingue trois types de liposomes:

a) les liposomes multilamellaires (MLV) comprenant plusieurs compartiments aqueux séparés par des bicouches lipidiques concentriques. Leur dimension est en général supérieure à 100 nm.

b) les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV), ils ne possèdent qu'une seule bicouche et par conséquent une seule cavité aqueuse. Leur taille est de l'ordre de 20 à 50 nm.

c) les liposomes unilamellaires de grande dimension (LUV), ils sont similaires aux SUV mais se différencient par leur grande taille qui peut atteindre plusieurs micromètres.

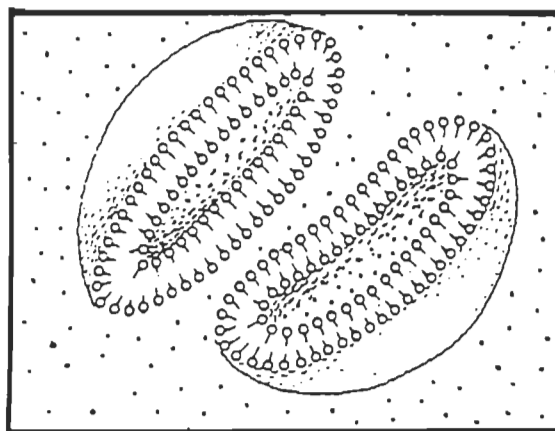


Figure 8: Schéma d'un liposome unilamellaire (174).

Pour l'étude de l'interaction entre l'actine et les membranes, nous avons utilisé deux types de liposomes: des petits liposomes unilamellaires (SUV) pour les expériences de nature physico-chimique ainsi que des liposomes unilamellaires de grande dimension (LUV) pour les études en microscopie électronique.

Les liposomes possèdent la propriété de mimer les membranes naturelles.

Il est possible de faire varier à volonté la composition des liposomes en lipides. Les chaînes d'acide gras des phospholipides peuvent être identiques ou de longueur variée avec, dans certains cas, des chaînes aliphatiques qui possèdent une ou plusieurs doubles liaisons. En plus des phospholipides, le cholestérol est souvent employé pour fabriquer des liposomes car on le retrouve en abondance dans les membranes naturelles.

Il existe plusieurs types de phospholipides qui diffèrent par leur tête polaire. La figure 9 montre la structure de quelques phospholipides naturels, de l'acide oléique et du cholestérol qui sont les lipides que nous avons utilisés dans notre recherche.

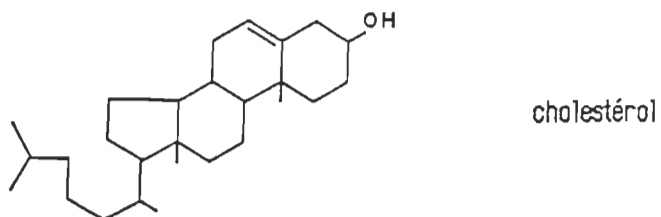
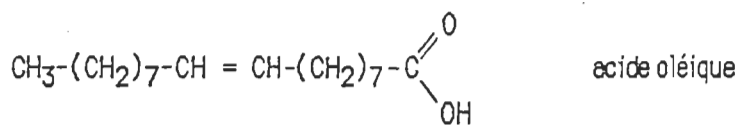
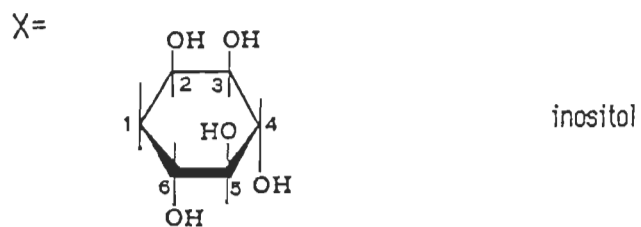
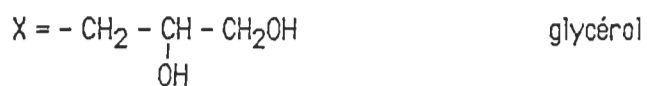
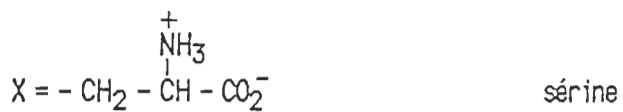
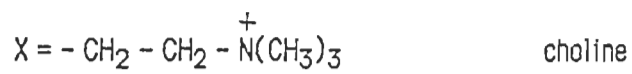
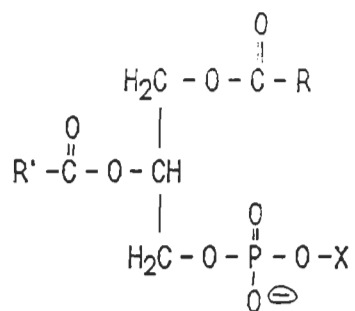


Figure 9: Structure des lipides utilisés dans notre recherche (27).

Les lipides illustrés à la figure 9 sont ceux que nous avons utilisés au cours de notre étude. Ils ont été choisis principalement parce qu'ils composent les membranes naturelles comme le montre le tableau II.

	<u>Myéline</u>	<u>Erythrocyte</u>	<u>Mitochondrie</u>	<u>Microsome</u>
Cholestérol	25	25	5	6
Phosphatidylsérine	7	11	0	0
Phosphatidylcholine	11	23	48	64
Phosphatidylinositol	0	2	8	11
Phosphatidylglycérol	0	0	1	2

Tableau II: Tableau représentant le pourcentage de quelques lipides présents dans les membranes naturelles (27).

#### V) Objectif du projet de recherche

Comme nous l'avons vu précédemment, l'actine est une protéine que l'on retrouve dans la plupart des cellules eucaryotes où elle joue deux rôles: protéine du cytosquelette qui permet le maintien de la forme des cellules, et protéine contractile impliquée dans les phénomènes de motilité. Pour qu'elle puisse accomplir ces deux fonctions, l'actine doit souvent être liée aux membranes. Le concept actuel dans ce domaine est que l'actine est attachée aux membranes par l'intermédiaire de protéines intégrales qui ont une affinité pour l'actine. Ces protéines contrôlèrent l'interaction actine-membranes.

Quelques rares auteurs (112, 113, 131, 162) ont cependant émis l'hypothèse d'une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires. Leurs études mènent à la conclusion qu'il n'existe pas d'interaction directe actine-lipides dans les cellules. En effet, d'après ces auteurs, le cholestérol inhiberait l'interaction actine-lipides, et une telle interaction ne se produirait qu'à la température de transition des lipides, qui est souvent très loin des températures auxquelles vivent les cellules.

Lors de mes études de maîtrise, j'ai pu mettre en évidence l'existence d'une interaction directe entre l'actine et les lipides chargés positivement. Ces résultats présentent un intérêt au point de vue de la recherche fondamentale mais n'ont que peu de rapport avec les systèmes biologiques puisque les membranes naturelles sont toutes chargées négativement.

Nous avons fait, par la suite, quelques expériences préliminaires avec des liposomes chargés négativement. Les résultats préliminaires obtenus sembleraient montrer que, dans certaines conditions, il pourrait exister une interaction entre l'actine et les lipides ayant une charge négative. Il devient alors intéressant d'étudier le phénomène plus en détail puisqu'il pourrait se produire dans les membranes naturelles. L'existence d'une interaction directe entre l'actine et les lipides va à l'encontre de ce qui est généralement admis dans la littérature sur ce sujet.

Le but de ce projet de doctorat consiste donc à déterminer s'il existe une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires neutres ou chargés négativement, puis déterminer dans quelles conditions elle peut se produire. Nous discuterons par la suite de la possibilité de l'existence d'un tel phénomène *in vivo*.

Pour procéder à ces études, nous utiliserons un modèle expérimental, constitué de membranes artificielles: les liposomes ainsi que de l'actine purifiée. Si une interaction se produit dans un tel système, il ne peut résulter que de l'interaction directe entre l'actine et les liposomes puisque ce sont les deux seuls constituants du milieu. De plus, dans un tel système, on peut faire varier à volonté la composition des liposomes ainsi que les conditions expérimentales.

Les techniques choisies pour l'étude de l'interaction actine-lipides naturels sont: la cosédimentation, la turbidimétrie, la mesure de la



perméabilité de la membrane des liposomes à un colorant fluorescent: la 5(6) carboxyfluorescéine (CF), les mesures de polarisation de fluorescence d'une sonde : le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH), la variation de fluorescence intrinsèque de l'actine et la microscopie électronique.

## Matériel et Méthodes

### I- Liste des produits chimiques

- Les lipides proviennent de Sigma Chemical co. (St-Louis, Mo.). Ils sont dissous dans une solution de chloroforme-méthanol (9:1), sauf l'acide oléique et le cholestérol qui sont en solution dans le chloroforme seulement. Aucun contrôle de pureté n'a été fait sur ces lipides.

	Numéro de catalogue Sigma
Phosphatidylcholine (PC)	P-5763
Phosphatidylglycérol (PG)	P-5531
Phosphatidylsérine (PS)	P-8518
Phosphatidylinositol (PI)	P-0639
Acide oléique (AO)	O-0750
Cholestérol (CH)	C-8253

- Le chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) et de calcium ( $CaCl_2$ ) proviennent de Fisher Co, Montréal.

- La sonde fluorescente: le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH), est obtenue de Aldrich Chemical Co. (Millwaukee, WI.).

- La 5(6) carboxyfluorescéine (CF) est achetée de Eastman Kodak (Rochester, N.Y.).

## II- Préparation des solutions

### A) Solutions tampons

Trois principaux tampons ont été utilisés: les tampons D, G et E.

	Concentrations en mM		
	tampon G	tampon D	tampon E
Tris-HCl pH 8.0	2.0	10.0	18.0
ATP	0.2	0.2	0.2
$\beta$ -mercaptoéthanol	0.5	0.5	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.2	0.1	-
KCl	-	40.0	80.0
MgCl <sub>2</sub>	-	1.0	2.0

Le tampon G a une basse force ionique. Il sert à diluer l'actine-G. Le tampon E a une haute force ionique. Il sert à polymériser l'actine-G en actine-F en mélangeant 1 volume d'actine-G, en solution dans le tampon G, avec 1 volume de tampon E. On obtient ainsi la composition du tampon D. Ce dernier tampon D est utilisé pour les réactions impliquant l'actine-F.

## B) Autres solutions

Des solutions mères de 100 mM de  $\text{CaCl}_2$  ou de  $\text{MgCl}_2$  sont préparées dans le tampon G ou le tampon D selon que les expériences sont effectuées avec de l'actine-G ou de l'actine-F.

Une solution concentrée de la sonde fluorescente 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) est préparée dans le tétrahydrofurane à 1.5 mg/ml.

La solution de 5(6) carboxyfluorescéine (CF) à concentration de 100 mM à pH 7.4 est obtenue par dissolution dans l'eau distillée. Le pH est ensuite ajusté avec du NaOH. La CF est utilisée telle quelle sans purification supplémentaire.

## III- Préparation des liposomes

### A) Liposomes unilamellaires de petite taille

Les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV) sont fabriqués par sonication (82). Vingt-cinq (25) milligrammes de lipides (33  $\mu\text{moles}$ ) dissous dans le chloroforme sont mis dans un ballon à joint rodé de 50 ml et le solvant est évaporé, sous pression réduite, à l'aide d'un rotoévaporateur Büchi modèle R-110. Les lipides, une fois asséchés, sont resuspendus dans 5 ml de phase aqueuse, le tout est mélangé au vortex jusqu'à ce que tous les lipides soient décollés de la paroi du ballon. La suspension lipides-phase

aqueuse est transférée dans un tube conique de 15 ml, et soumise aux ultrasons à l'aide d'un sonicateur Mégason modèle P-300, équipé d'une sonde, durant 1 heure à 30°C. Après sonication, les liposomes sont centrifugés 10 minutes à 110000 g pour enlever les particules de titane qui se sont détachées de la sonde ainsi que les gros liposomes qui ont pu demeurer dans la solution.

Les liposomes neutres sont composés de 100% PC ou de 90% PC et 10% CH. Les liposomes chargés négativement contiennent 90% PC et 10% d'un autre lipide soit: AO, PS, PI ou PG. Ce pourcentage de lipides représente le rapport molaire de chacun des lipides.

#### B) Les liposomes unilamellaires de grande taille

Les liposomes unilamellaires de grande dimension sont préparés par la technique en phase inversée mise au point par Szoka et Papahadjopoulos (149).

La préparation comprend deux étapes: La première étape consiste à former des micelles inversées, par sonication. Ces micelles en suspension dans une phase organique sont constituées de gouttelettes de phase aqueuse entourées de lipides. La deuxième étape consiste à évaporer lentement la phase organique. On obtient alors un "gel" où les micelles sont si proches les unes des autres que la friction, entre elles, cause la rupture de certaines et par le fait même la libération de la phase aqueuse de ces micelles brisées. On

assiste alors à l'organisation en bicouche des lipides et à la formation de liposomes.

Dans une préparation typique, 72  $\mu$ moles de lipides dissous dans le chloroforme-méthanol sont introduits dans un ballon à joint rodé de 50 ml. Le solvant est évaporé, sous pression réduite, à l'aide d'un rotoévaporateur Büchi modèle R-110. Une fois asséchés, les lipides sont redissous dans 3 ml d'éther. On ajoute ensuite 1 ml de phase aqueuse. Le mélange est soumis à un bain d'ultra-sons Mégason modèle P-300 fonctionnant à intensité moyenne, durant 5 minutes. Il se forme alors une suspension de phase aqueuse dans l'éther. L'éther est évaporé lentement au rotoévaporateur jusqu'à formation des liposomes. Ceux-ci sont resuspendus dans 2 ml de phase aqueuse et agités vigoureusement à l'aide d'une pipette pasteur. L'évaporation sous pression réduite se poursuit pendant encore 10 minutes. On récolte environ 3 ml de suspension de liposomes.

#### IV- Préparation de l'actine

L'actine du muscle squelettique de lapin est purifiée à partir de la poudre acétonique par la méthode de Spudich et Watt (144) modifiée par Nonomura et coll. (110).

La concentration de l'actine est déterminée en mesurant l'absorbance d'une solution d'actine à 290 nm. Le coefficient d'extinction molaire dans ces conditions est de 0.63 (86) dans une cuvette de 1 cm de parcours optique.

L'actine-G est dissoute dans le tampon G. L'actine-F est préparée en mélangeant des volumes égaux d'actine-G et de tampon E, ce qui induit la polymérisation de l'actine. L'actine est par la suite diluée aux concentrations désirées avec du tampon D.

La préparation de l'actine-F subit quelques modifications selon les expériences. Par exemple, dans l'étude de l'influence du  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'interaction actine-liposomes, l'actine-F est dissoute dans des solutions de tampon D et E dans lesquels le  $\text{CaCl}_2$  est exclu. Du  $\text{CaCl}_2$  est ensuite ajouté à concentration désirée.

#### V- Techniques de mesure de l'interaction entre l'actine et les liposomes

##### A) Mesure par turbidimétrie et cosédimentation

###### Principe de la turbidimétrie

L'interaction entre l'actine et les liposomes entraîne parfois la formation d'agrégats. L'intensité de l'agréation est mesurable au spectrophotomètre UV-visible par turbidimétrie, à une longueur d'onde de 350 nm.

Certains résultats sont exprimés en turbidité différentielle (Td) c'est-à-dire en soustrayant la turbidité des liposomes seuls (Tl) et de l'actine seule (Ta) de la turbidité du mélange actine + liposomes (Tal).

$$T_d = T_{al} - (T_a + T_l)$$

La turbidité différentielle représente donc la turbidité qui résulte seulement de l'interaction entre l'actine et les liposomes. Il est à noter que les mesures de turbidité des liposomes seuls et de l'actine seule sont effectuées dans les mêmes conditions expérimentales que le mélange actine-liposomes.

#### Principe de la cosédimentation

La méthode consiste à centrifuger un mélange d'actine et de liposomes, à une vitesse suffisante pour sédimenter les agrégats actine-liposomes en suspension dans la solution, mais non l'actine, ou les liposomes seuls. On mesure alors la turbidité de l'actine et des liposomes libres dans le surnageant par spectrophotométrie à 350 nm. En général, plus il y a d'interaction entre l'actine et les liposomes, plus les agrégats sont gros et nombreux; et moins il reste d'actine et de liposomes dans le surnageant après centrifugation.



## Protocoles expérimentaux pour les techniques de turbidimétrie et de cosédimentation

### 1) Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes (SUV)

Un volume de 3 ml d'actine aux concentrations indiquées dans les résultats est déposé dans une batterie de tubes à centrifugation. A chacun des tubes est ajouté 100  $\mu$ l de liposomes à 6.5  $\mu$ moles de lipides/ml. Le mélange est agité le plus rapidement possible et laissé au repos pendant 30 minutes à température ambiante. Après agitation des tubes, pour obtenir une solution homogène, un (1) ml est alors prélevé et la turbidité lue immédiatement au spectrophotomètre à 350 nm. Le volume qui reste (2 ml) est centrifugé à 7000g pendant 10 minutes à 25°C. La turbidité du surnageant recueilli est mesurée à 350 nm.

### 2) Influence des cations divalents sur l'interaction actine-liposomes (SUV)

Dans des tubes à centrifugation, on dépose 2.55 ml d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  afin d'obtenir les concentrations finales indiquées dans les résultats. On ajoute par la suite 0.45 ml d'actine à 2 mg/ml puis 100  $\mu$ l de liposomes à 6.5  $\mu$ moles de lipides/ml. Le mélange est agité par inversion des tubes et laissé au repos 30 minutes à température de la pièce.

On mesure l'interaction actine-liposomes par turbidimétrie et par cosédimentation comme décrit précédemment.

### 3) Influence des cations divalents sur les liposomes (SUV) seuls et l'actine seule

Comme les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ont une action sur l'actine seule et les liposomes seuls, des témoins qui contiennent soit seulement des liposomes soit seulement de l'actine sont préparés pour chacune des concentrations de cations divalents étudiées. Ces témoins sont traités de façon identique aux mélanges actine-liposomes.

### B) Mesure de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine (CF)

#### Principe de la méthode

Cette technique mise au point par Weinstein et coll. (173) permet de mesurer la perméabilité des liposomes à la CF. Les liposomes sont constitués de bicouches lipidiques et l'interaction d'une substance avec la bicouche peut causer une perturbation de cette bicouche et laisser fuir le contenu du liposome.

Dans cette expérience, la 5(6) carboxyfluorescéine (CF), qui est une substance fluorescente, est encapsulée dans les liposomes. A forte concentration, 10 mM et plus, la CF n'émet pas de fluorescence à cause du phénomène d'extinction ("quenching"). Lorsque de la CF concentrée est encapsulée dans les liposomes, elle n'émet donc pas de fluorescence. Par

contre, lorsque les liposomes deviennent perméables, la CF libérée se dilue dans le milieu environnant et émet alors de la fluorescence. Plus le liposome est perméable, plus de CF se retrouve diluée dans le milieu et plus le signal de fluorescence est intense.

Les liposomes sont préparés par sonication en présence de CF à forte concentration, 100 mM. Pendant la formation des liposomes, de la CF est encapsulée à l'intérieur des liposomes. Afin d'éliminer la CF qui se trouve à l'extérieur des liposomes, on procède à une chromatographie sur colonne de séphadex 4B-CL de 1.5 X 30 cm. Les liposomes purifiés sont utilisés immédiatement.

#### Protocoles expérimentaux pour l'étude de la perméabilité des liposomes (SUV)

##### 1) Influence de la concentration d'actine sur la perméabilité des liposomes

A un volume de 3 ml d'actine, aux concentrations indiquées dans les résultats, est ajouté 50  $\mu$ l de liposomes à 6.5  $\mu$ moles de lipides/ml dans lesquels est encapsulée de la CF (100 mM). Les mélanges actine-liposomes sont agités aussitôt et laissés au repos à température de la pièce durant exactement 30 minutes. On mesure alors la fluorescence, à l'aide d'un spectrofluorimètre Shimadzu, modèle RF-540. La longueur d'onde d'excitation est de 496 nm et celle d'émission de 514 nm. Les fentes d'excitation et d'émission ont une ouverture de 5 nm.

## 2) Influence des cations divalents sur la perméabilité des liposomes

Dans une série de tubes, on dépose 2.55 ml d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  afin d'obtenir les concentrations finales indiquées dans les résultats. On ajoute ensuite 0.45 ml d'actine (2 mg/ml) puis 50  $\mu\text{l}$  de liposomes à 6.5  $\mu\text{moles}$  de lipides/ml dans lesquels est encapsulée de la CF (100 mM). Après mélange, on laisse reposer pendant 30 minutes à température ambiante, puis on mesure la fluorescence.

Afin de voir si les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ne modifient pas la perméabilité des liposomes, pour chaque concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , un témoin qui ne contient pas d'actine a été fait et traité de façon identique aux mélanges actine-liposomes.

## 3) Influence de l'actine et des cations divalents sur la carboxyfluorescéine seule

Afin de vérifier si l'actine ainsi que les ions divalents  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ne modifient pas la fluorescence de la CF, nous avons fait des témoins contenant de la CF mélangée à plusieurs concentrations d'actine ou d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ . Aucune modification de fluorescence de la CF n'a été observée.

Pour déterminer l'intensité réelle ( $I_r$  al) de fluorescence lors de l'interaction actine-liposomes avec ou sans ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , nous avons soustrait l'intensité initiale de fluorescence des liposomes seuls ( $I_0$  l) de l'intensité de fluorescence des mélanges actine-liposomes après 30 minutes d'incubation ( $I_{30}$  al).

Ainsi, l'intensité réelle de fluorescence des mélanges actine-liposomes sera donnée par l'équation:

$$(I_r aI) = (I_{30} aI) - (I_0 I)$$

C) Mesure de la fluidité des bicouches lipidiques (SUV) par polarisation de fluorescence de la sonde 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH)

Principe de la méthode

Cette technique fut utilisée la première fois par Shinitsky et coll (137). Elle permet de mesurer des modifications de la fluidité de la bicouche lipidique des liposomes. La sonde hydrophobe DPH, en contact avec les liposomes, va s'incorporer au niveau des chaînes d'acides gras des lipides. La sonde a une orientation bien définie et possède une liberté de mouvement restreinte, on mesure alors une certaine valeur de polarisation de fluorescence. Si une perturbation de la bicouche survient en faisant varier les conditions du milieu, cette perturbation peut modifier l'orientation de la sonde en augmentant ou diminuant la liberté de mouvement de cette sonde. Ces variations de mobilité se traduisent par une diminution ou une augmentation du degré de polarisation de fluorescence de la sonde. Si les conditions du milieu provoquent une fluidification des chaînes d'acides gras des lipides, on notera une diminution de la valeur de polarisation de la sonde et vice versa si les chaînes d'acides gras se rigidifient sous l'action de certains facteurs environnants.

### Protocoles expérimentaux pour l'étude de la fluidité des liposomes (SUV)

Les liposomes préparés par sonication sont séparés en deux solutions de volumes égaux. A une des solutions, on ajoute, rapidement et sous agitation énergique, la sonde DPH de façon à obtenir un rapport lipide-sonde de 750:1 (137). Cette préparation est incubée toujours sous agitation pendant deux (2) heures à température de la pièce, à l'abri de la lumière, pour permettre l'incorporation de la sonde dans la bicouche. L'autre moitié de la préparation de liposomes servira de témoin pour des mesures de diffusion de lumière.

#### 1) Influence de la concentration d'actine sur la fluidité de la bicouche lipidique

A un volume de 3 ml d'actine, aux concentrations indiquées dans les résultats, est ajouté 75  $\mu$ l de liposomes à 6.5  $\mu$ moles de lipides/ml contenant la sonde DPH. Les mélanges actine-liposomes sont agités aussitôt et laissés au repos à température ambiante durant 30 minutes. Les intensités de fluorescence sont mesurées et le degré de polarisation calculé de la façon décrite plus loin.

#### 2) Influence des cations divalents sur la fluidité de la bicouche lipidique

A 3 ml d'un mélange d'actine et de liposomes, aux concentrations finales de 0.3 mg/ml et 0.5 mM respectivement, ou de liposomes seuls, est

ajouté un faible volume d'une solution-mère d'ions divalents, le  $\text{CaCl}_2$  ou le  $\text{MgCl}_2$  selon le cas, de façon à obtenir la concentration de cations divalents désirée soit 1, 10 ou 20 mM. Les intensités de fluorescence sont ensuite mesurées et le degré de polarisation calculé.

### 3) Influence de l'actine seule sur la sonde DPH

Pour détecter une éventuelle interaction directe entre l'actine et la sonde DPH, nous avons mélangé ces deux composés et mesuré la fluorescence du mélange. Aucune fluorescence n'a été observée dans ce mélange. Il est à noter que la sonde DPH seule en solution dans une phase aqueuse n'émet pas de fluorescence (137).

### 4) Calcul du degré de polarisation de la sonde DPH

Le degré de polarisation est calculé selon l'équation donnée par Shinitzky et coll. (137).

$$P = \frac{1 - G (I_{0,0}^* - I_{0,0} / I_{0,90}^* - I_{0,90})}{1 + G (I_{0,0}^* - I_{0,0} / I_{0,90}^* - I_{0,90})}$$

P= degré de polarisation

$I_{0,0}$  et  $I_{0,90}$  = intensités de la lumière fluorescente détectée lorsque les polariseurs d'excitation et d'émission sont orientés

parallèlement ( $I_{0^\circ,0^\circ}$ ) et perpendiculairement ( $I_{0^\circ,90^\circ}$ ) l'un par rapport à l'autre

$I^*$  = intensité de fluorescence des mélanges actine-liposomes contenant la sonde DPH

$I$  = valeur de diffusion de lumière des mélanges actine-liposomes sans sonde DPH. Les mélanges actine-liposomes peuvent dans certaines conditions, causer une diffusion de la lumière. Des mélanges actine-liposomes sans sonde DPH furent préparés et les valeurs de diffusion de lumière mesurées de la même façon que pour les mélanges actine-liposomes contenant la sonde.

$G$  = facteur de correction. L'instrument ne transmet pas de façon égale la lumière émise par les polariseurs d'excitation et d'émission lorsque ceux-ci sont en position  $0^\circ$  et  $90^\circ$ .

$$G = \frac{I_{90^\circ,90^\circ}^* - I_{90^\circ,90^\circ}}{I_{90^\circ,0^\circ}^* - I_{90^\circ,0^\circ}}$$

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont de 360 et 430 nm respectivement avec des fentes d'excitation de 2 nm et d'émission de 10 nm.

#### D) Mesure de la fluorescence intrinsèque de l'actine

##### Principe de la méthode

Les protéines, dont l'actine, possèdent des acides aminés tyrosine et tryptophane qui, lorsqu'ils sont excités par la lumière, émettent une fluorescence. Les protéines ont donc, de par la présence de ces acides aminés, une fluorescence qui leur est propre: c'est la fluorescence intrinsèque. S'il se produit un changement de conformation de la protéine, il peut se produire,



dans certains cas, une modification de l'environnement de ces acides aminés qui peut entraîner un changement de la fluorescence intrinsèque de la protéine. Trois changements peuvent se produire (41):

- 1) déplacement (43) du pic maximum d'émission de fluorescence et/ou
- 2) diminution (48) ou
- 3) augmentation (45, 167) de la valeur de fluorescence du pic maximum

L'analyse du spectre d'émission de fluorescence intrinsèque des protéines fut utilisée dans plusieurs cas pour observer les changements de conformation qui peuvent se produire dans les protéines (43, 44, 48, 58, 74, 150, 168 ).

Lehrer et Derwar (86) ont montré que l'actine a une fluorescence intrinsèque dont le pic maximum d'émission est à 328 nm. Nous allons donc utiliser cette technique dans le but de voir si la présence de liposomes, entraîne un changement conformationnel de l'actine.

#### Protocole expérimental pour la mesure de la fluorescence intrinsèque de l'actine

Des mélanges composés d'actine et de liposomes, à des concentrations finales de 0.3 mg/ml et 0.5 mM respectivement, en absence ou en présence de 20 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  sont introduits dans le spectrofluorimètre. On trace le spectre d'émission de 300 à 350 nm. La longueur d'onde d'excitation

est de 297 nm. L'ouverture des fentes d'excitation et d'émission est de 2 nm.

Les spectres d'émission de fluorescence de l'actine seule et des liposomes seuls, dans les mêmes conditions que les mélanges actine-liposomes, ont aussi été tracés.

#### E) Microscopie électronique à transmission

Les préparations d'actine et de liposomes (LUV) sont observées au microscope électronique après coloration négative.

Une goutte du mélange actine-liposomes, à des concentrations et dans les conditions ioniques indiquées dans les résultats, est déposée sur une grille recouverte de formvar-carbone. Le surplus du mélange est enlevé à l'aide d'un papier filtre. La préparation est colorée négativement avec de l'acétate d'uranium 1% en solution aqueuse. Les préparations sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Phillips 201 fonctionnant à 80 kV.

## Résultats

### I- Mise en évidence de l'interaction entre l'actine et les liposomes (SUV) par turbidimétrie et cosédimentation.

Lorsque l'on mélange de l'actine avec des liposomes, il se forme parfois un précipité. Cette réaction de précipitation montre qu'il y a une interaction entre l'actine et les liposomes. Le phénomène peut être quantifié par turbidimétrie. Ainsi, plus il y a d'agrégats formés et/ou plus ces agrégats sont gros, plus la turbidité des mélanges actine-liposomes sera élevée.

D'autre part, il est possible d'obtenir une estimation de la taille des agrégats formés en centrifugeant le mélange actine-liposomes à une vitesse qui sédimente les agrégats actine-liposomes mais laisse les liposomes et l'actine non-liés dans le surnageant. Plus les agrégats sont gros, plus ils vont sédimenter facilement laissant peu d'actine et de liposomes libres dans le surnageant.

Les valeurs de turbidimétrie et de cosédimentation sont donc une mesure de l'interaction actine-liposomes, à condition toutefois que cette interaction se traduise par la formation d'agrégats.

A) Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes en absence de cations divalents

1) interaction entre l'actine-G et les liposomes en absence de cations divalents

La figure 10 montre les valeurs de turbidité, avant centrifugation (figure 10 A) et après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes (figure 10 B), de mélanges de liposomes de composition et de charges différentes, en présence de concentrations croissantes d'actine-G et ceci en absence de cations divalents.

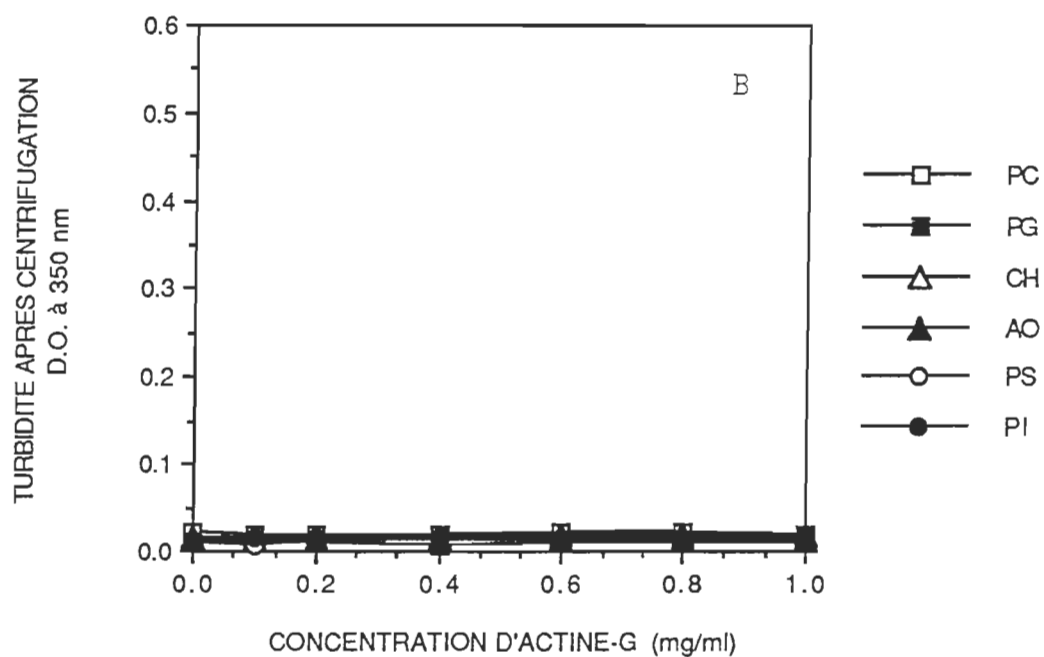
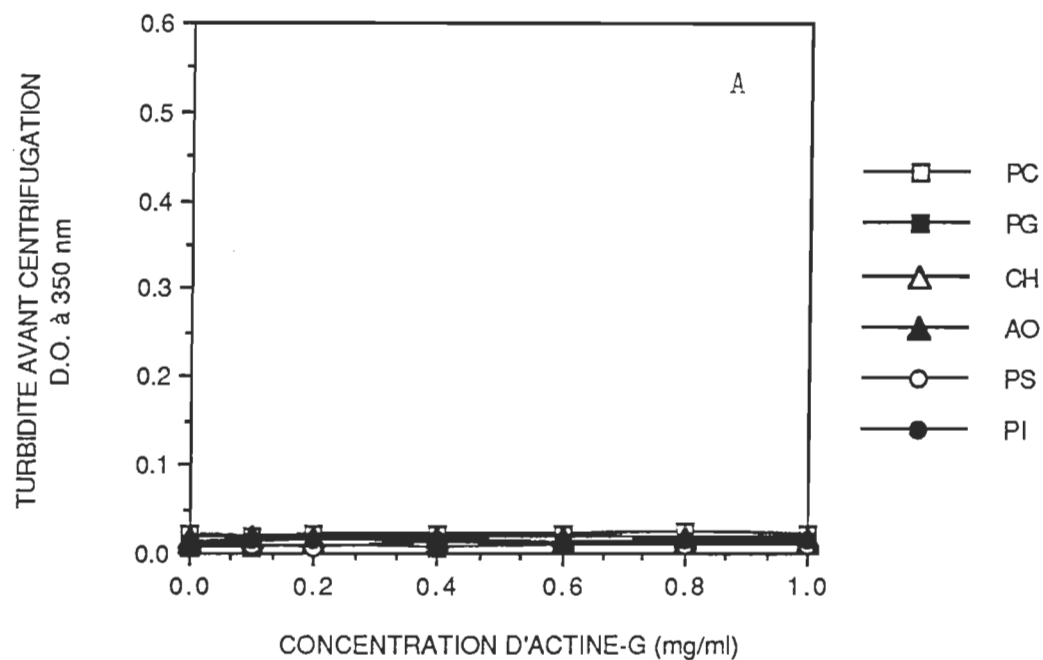
Quelle que soit la concentration d'actine-G, la charge ou la composition des liposomes, aucune augmentation de turbidité n'est observée lors de l'ajout d'actine à ces liposomes (figure 10 A).

Les expériences de cosédimentation des mélanges actine-G-liposomes compilées à la figure 10 B montrent que les valeurs de turbidité mesurées dans le surnageant après sédimentation à 7000g pendant 10 minutes restent constantes quelle que soit la concentration d'actine-G la composition et la charge des liposomes.

De ces deux expériences, on peut conclure qu'en absence de cations divalents, l'actine-G ne forme pas d'agrégats avec les liposomes, du moins dans les conditions expérimentales utilisées ici.

Figure 10. Turbidité mesurée à 350 nm des mélanges actine-G-liposomes avant (A) et après (B) centrifugation à 7000g pendant 10 minutes en fonction de la concentration d'actine-G. Concentration finale de lipides de 0.21 mM. L'actine-G et les liposomes sont dissous dans du tampon G, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ .

# Turbidité des mélanges actine-liposomes (SUV) en fonction de la concentration d'actine-G en absence de cations divalents



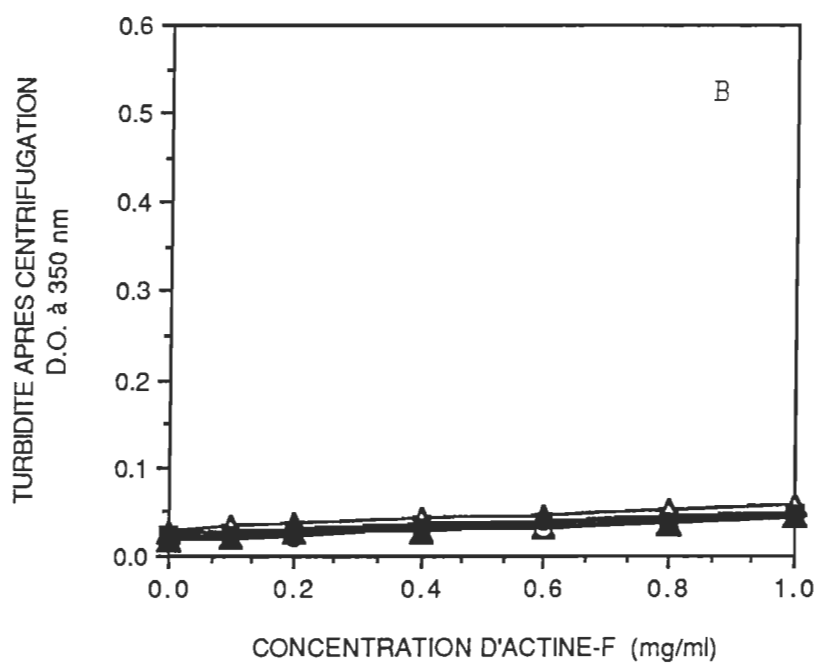
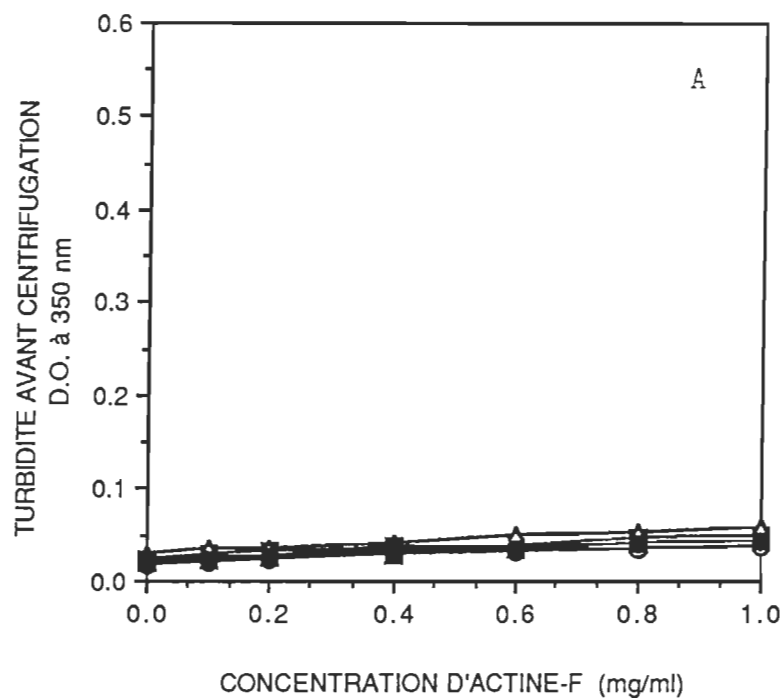
## 2) interaction entre l'actine-F et les liposomes en absence de cations divalents

La figure 11 A montre les mesures de turbidité avant centrifugation de solutions de liposomes en présence de concentrations croissantes d'actine-F. Il se produit une légère augmentation de la turbidité des mélanges actine-F-liposomes en fonction de la concentration d'actine-F. Cette faible hausse de turbidité se produit quelle que soit la composition du liposome. Cette faible augmentation de turbidité, qui est de l'ordre de 0.02 unité, n'est probablement pas significative. En effet, si cette augmentation de turbidité, avant centrifugation, des mélanges actine-liposomes résultait de la formation d'agrégats entre les deux composants, on devrait observer une baisse de turbidité dans le surnageant des mélanges actine-F-liposomes après cosédimentation, puisque les agrégats seraient sédimentés lors de la centrifugation. Les résultats de cosédimentation présentés à la figure 11 B montrent qu'il n'en est pas ainsi. La turbidité, après centrifugation, des mélanges de liposomes en fonction de la concentration d'actine-F augmente, mais ces valeurs de turbidité sont aussi très faibles et égales à celles mesurées avant cosédimentation.

On peut donc conclure de ces expériences, qu'il ne se produit pas d'agrégation entre l'actine-F et les liposomes en absence de cations divalents du moins dans les conditions expérimentales utilisées ici.

Figure 11. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-F-liposomes avant (A) et après (B) centrifugation à 7000g pendant 10 minutes en fonction de la concentration d'actine-F. Concentration finale de lipides de 0.21 mM. L'actine-F et les liposomes sont dissous dans du tampon D sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ .





## B) Influence des cations divalents sur l'interaction actine-liposomes

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont présents dans la cellule et impliqués dans la régulation de nombreux phénomènes biologiques. Il est donc pertinent d'étudier l'influence de ces cations sur l'interaction actine-liposomes.

### 1) Interaction entre l'actine-G et les liposomes en présence de cations divalents

Les figures 12 à 19 illustrent l'effet des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sur l'interaction entre l'actine-G et des liposomes de différentes compositions.

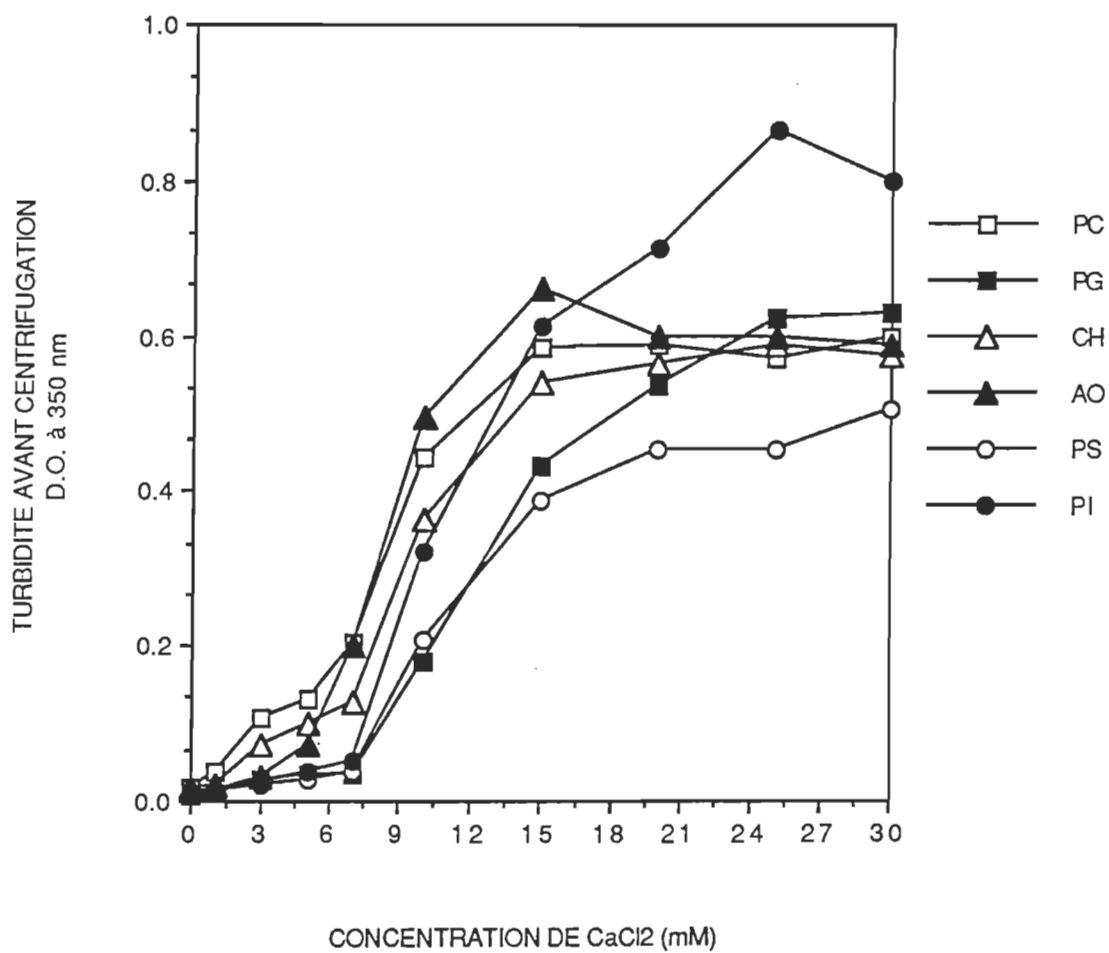
#### - influence des ions $\text{Ca}^{2+}$

La figure 12 illustre les turbidités obtenues avant centrifugation des mélanges actine-G-liposomes pour des concentrations croissantes d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et pour différentes compositions en lipides.

On remarque que pour tous les mélanges actine-G-liposomes, il y a augmentation de la turbidité en fonction de la concentration de calcium. Cette augmentation de turbidité se fait en trois phases. De 0 à 7 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , on observe une faible augmentation de la turbidité. Par la suite, la turbidité augmente plus rapidement en présence de 7 à 15 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . En présence de concentrations supérieures à 15 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , les valeurs de turbidité atteignent un plateau.

Figure 12. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-G-liposomes avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G.

Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$



Comme en présence de fortes concentrations de cations divalents c'est-à-dire supérieure à 1 mM, l'actine-G polymérise pour former des filaments et, à de plus fortes concentrations des paracristaux, les solutions deviennent turbides. Comme on peut le constater à la figure 13, la turbidité des solutions d'actine seule augmente à partir de 3 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  puis demeure constante à des concentrations d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  au-dessus de 25 mM.

Par contre, la turbidité de solutions de liposomes seuls en présence de concentrations croissantes d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ne subit pas de modification. La figure 14 montre les résultats des valeurs de turbidité des témoins contenant uniquement des liposomes de différentes compositions en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Les solutions de liposomes ont une faible valeur de turbidité et celle-ci demeure constante en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les valeurs de turbidité, après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes, de mélanges actine-G-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont compilées à la figure 15. Pour de faibles concentrations d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , de 0 à 5 mM, il se produit une faible hausse de la turbidité du surnageant après centrifugation à basse vitesse. Par contre, pour des concentrations de  $\text{CaCl}_2$  supérieures à 5 mM, la turbidité du surnageant après sédimentation diminue pour ensuite augmenter légèrement à des concentrations supérieures à 15 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces hausses ne sont pas dues à l'actine seule puisque entre 0 et 7 mM, l'actine est peu turbide et qu'à des concentrations supérieures en cations, l'actine sédimente pour laisser un surnageant clair exempt de toute turbidité.

Figure 13. Turbidité à 350 nm de solutions d'actine-G avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml en solution dans le tampon G.

Turbidité de l'actine-G seule en fonction  
de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$

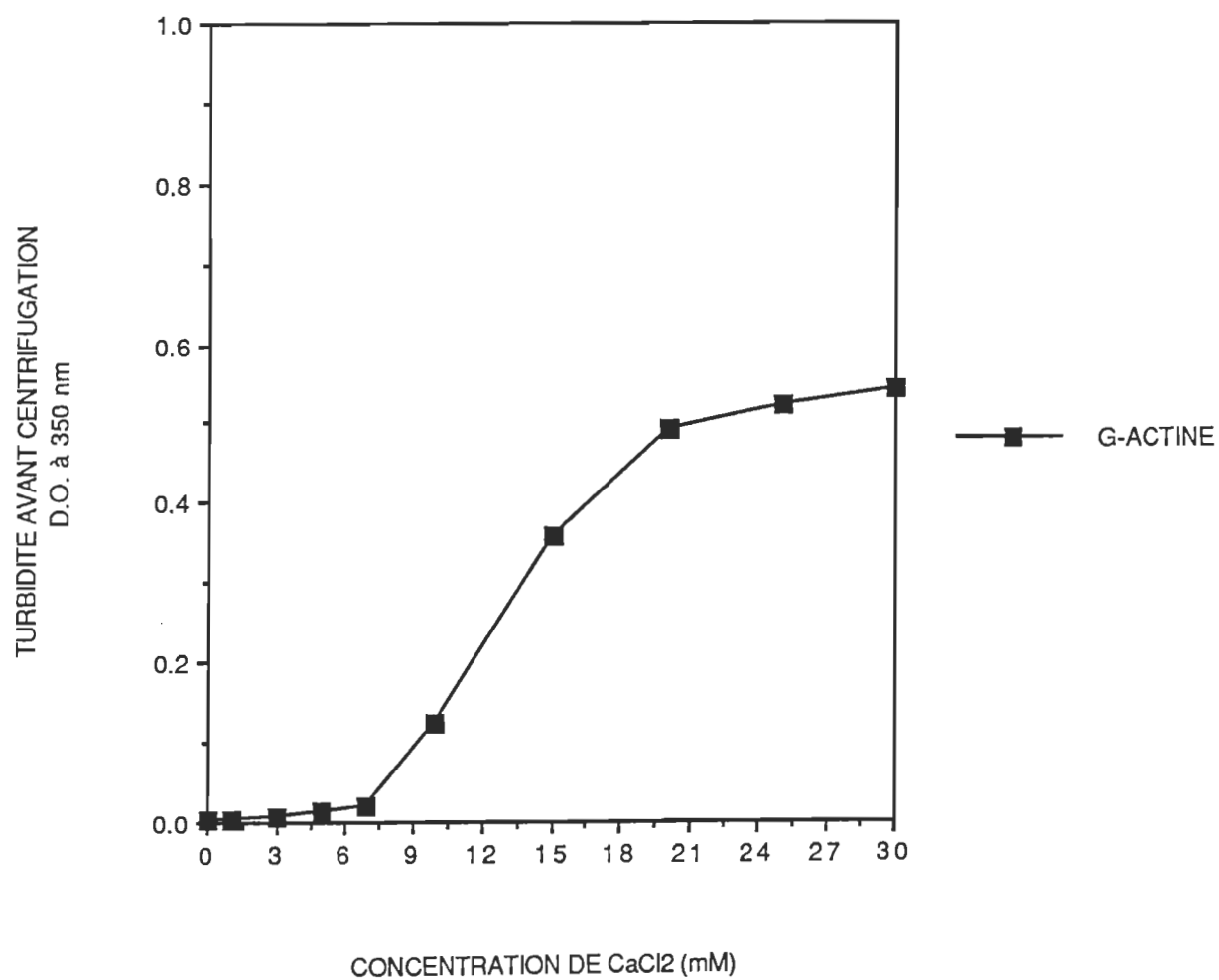


Figure 14. Turbidité à 350 nm de liposomes de différentes compositions avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G.



Turbidité des liposomes seuls en fonction  
de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$

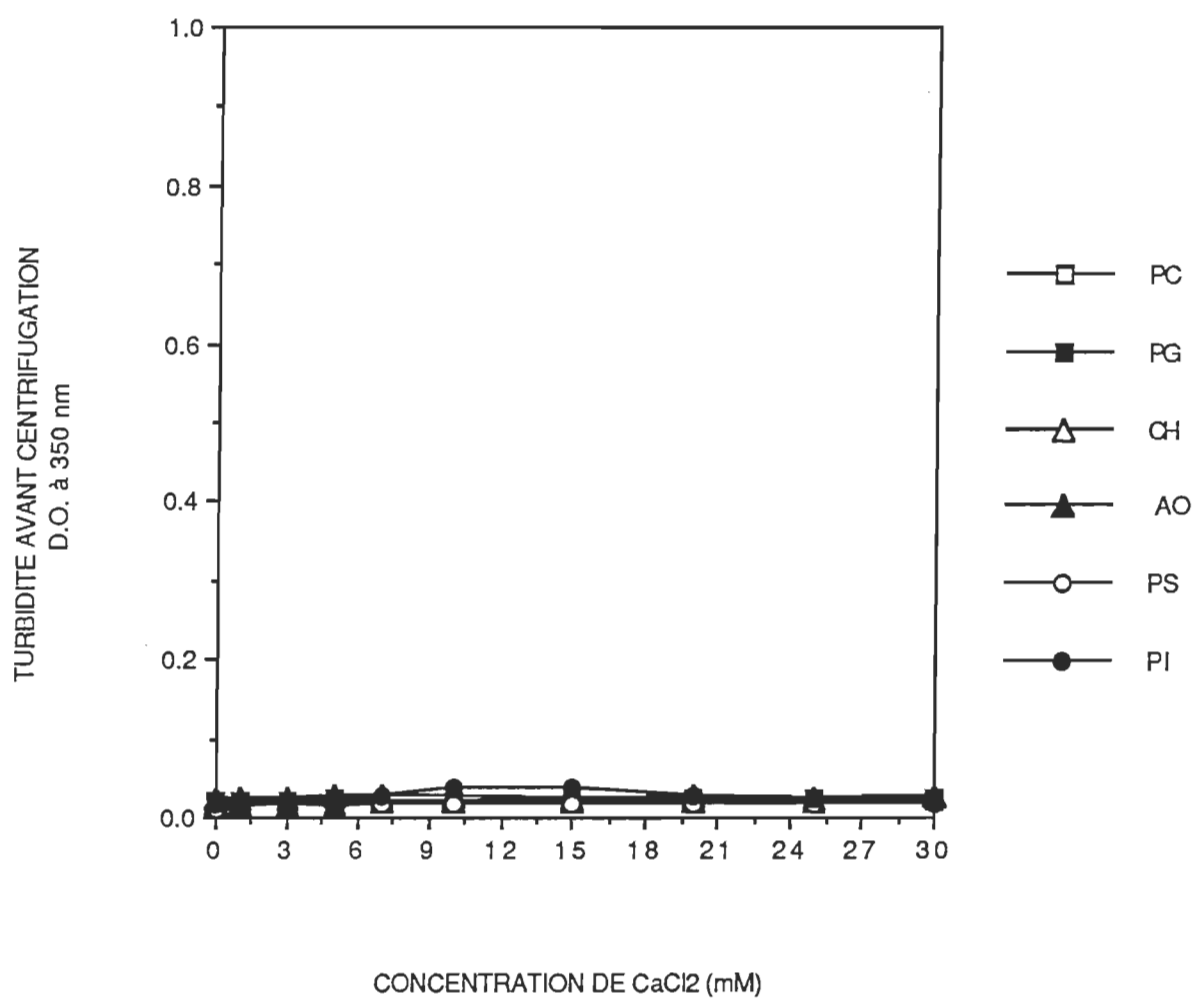
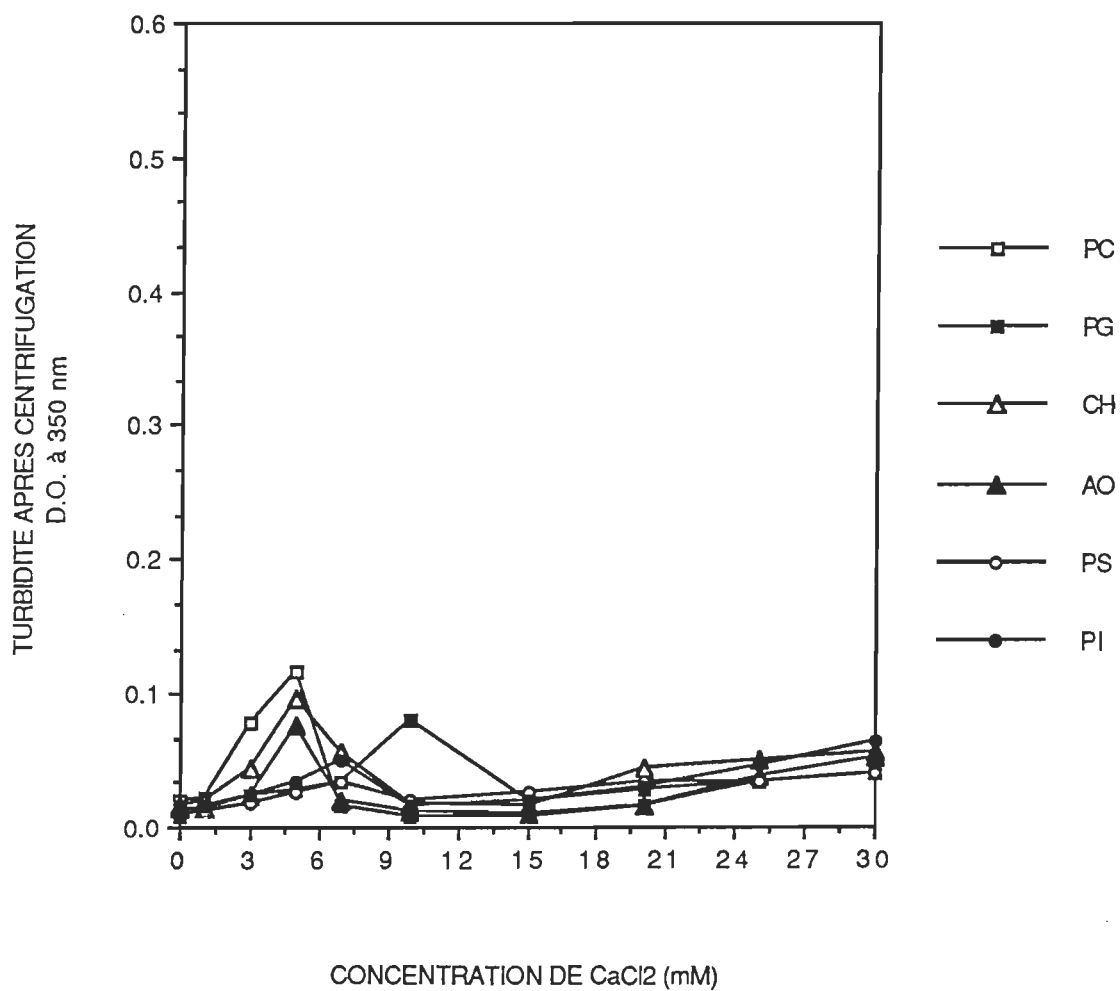


Figure 15. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-G-liposomes après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G.

Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$



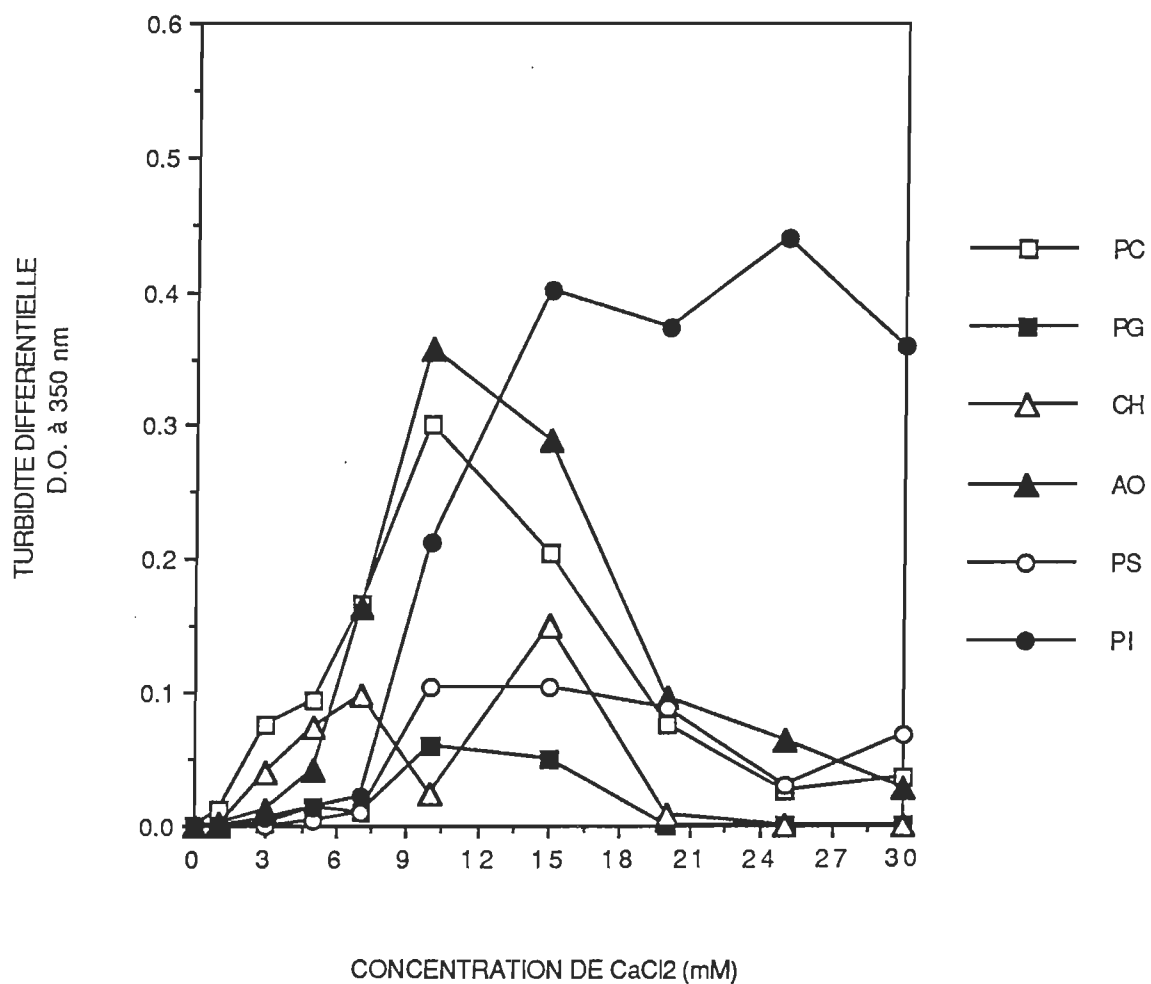
Nous interprétons ces résultats comme suit: Pour des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  inférieures à 5 mM, il se forme de petits agrégats entre l'actine et les liposomes mais qui sont trop petits pour sédimenter lors de la centrifugation à 7000g pendant 10 minutes. En présence de plus fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$ , ces agrégats deviennent plus gros et séimentent après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes.

Comme nous l'avons vu à la figure 13, une solution d'actine seule en présence de fortes concentrations de cations  $\text{Ca}^{2+}$  montre une certaine turbidité puisque l'actine forme des paracristsaux. Cette turbidité contribue aux valeurs obtenues pour les mélanges actine-liposomes. Il est donc plus approprié d'exprimer les résultats en turbidité différentielle qui représente la turbidité résultant de l'interaction entre l'actine et les liposomes seulement.

La figure 16 montre les valeurs de turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes en présence de concentrations croissantes d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour toutes les compositions de liposomes, les turbidités différentielles augmentent en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  jusqu'à une concentration d'environ 10 mM. En présence de concentrations plus élevées d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , les turbidités différentielles diminuent, quelle que soit la composition des liposomes. Dans le cas du mélange actine-G avec les liposomes PC:PI, il y a une hausse de turbidité différentielle jusqu'à 15 mM de  $\text{CaCl}_2$  suivie d'un plateau.

Figure 16. Turbidité différentielle à 350 nm de mélanges actine-G-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G .

Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes (SUV) en  
fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$



- influence des ions  $Mg^{2+}$

Les graphiques des valeurs de turbidité avant (figure 17) et après (figure 18) centrifugation à 7000g pendant 10 minutes des mélanges actine-G-liposomes en présence de concentrations croissantes d'ions  $Mg^{2+}$  sont semblables aux graphiques obtenus dans le cas des ions  $Ca^{2+}$ . La figure 17 montre les valeurs de turbidité avant centrifugation des mélanges actine-G-liposomes. Dans ce cas aussi, l'augmentation de la turbidité se fait en trois étapes. Une faible hausse de turbidité de 0 à 15 mM de  $MgCl_2$ , une augmentation rapide de 15 à 25 mM et une stabilisation pour des concentrations supérieures à 25 mM.

Les valeurs de turbidité après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes sont montrées à la figure 18. Tout comme dans le cas du  $Ca^{2+}$ , on note une hausse de la turbidité du surnageant après centrifugation, en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Cette hausse est cependant beaucoup plus faible qu'avec le  $Ca^{2+}$  et atteint un maximum pour des concentrations de l'ordre de 15 mM de  $Mg^{2+}$ . Là aussi, nous interprétons le phénomène comme étant dû à la formation d'agrégats entre l'actine et les liposomes qui, à des concentrations supérieures à 15 mM d'ions  $MgCl_2$  deviennent assez gros pour être sédimentés à 7000g pendant 10 minutes.

Comme la turbidité des paracristaux d'actine formés en présence d'ions  $Mg^{2+}$  (même effet que les ions  $Ca^{2+}$ ) contribue aux valeurs de turbidité des mélanges actine-liposomes, les résultats sont exprimés en turbidité

Figure 17. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-G-liposomes avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G.



Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$

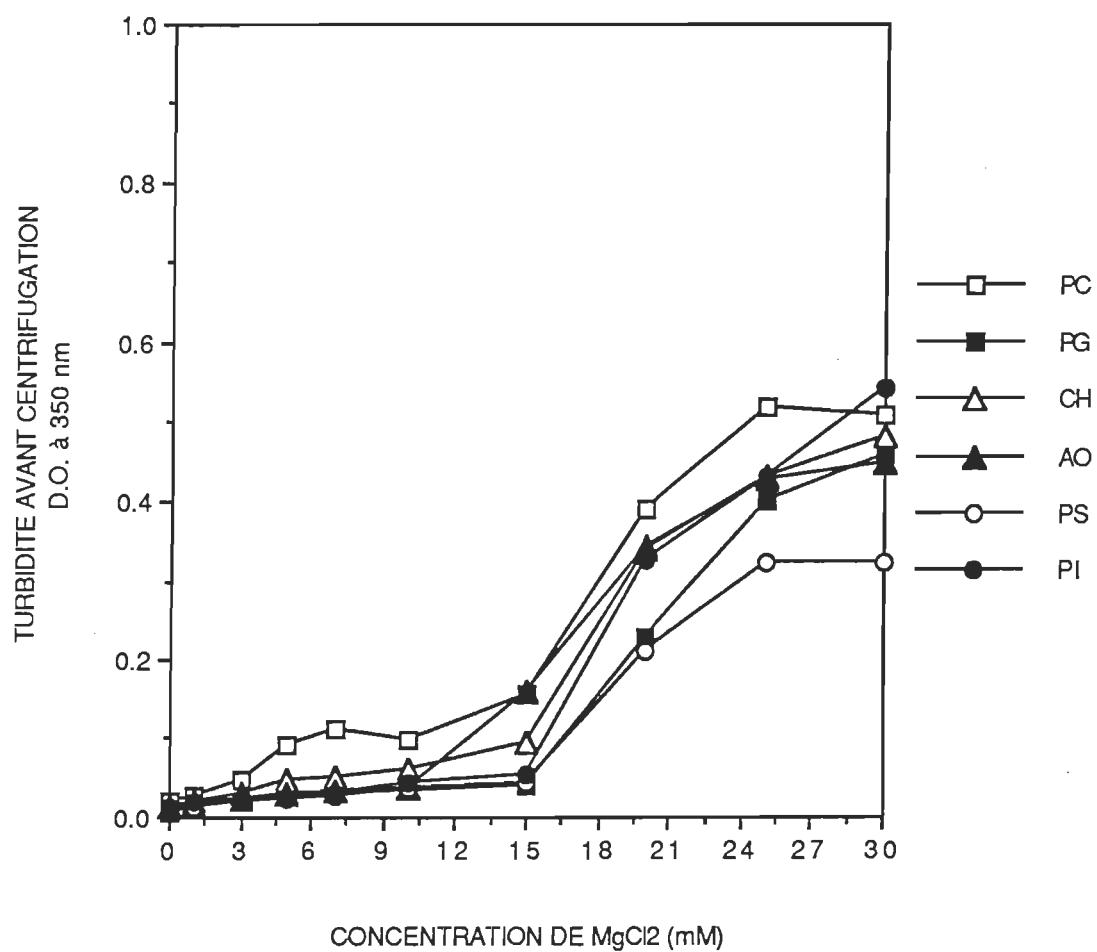
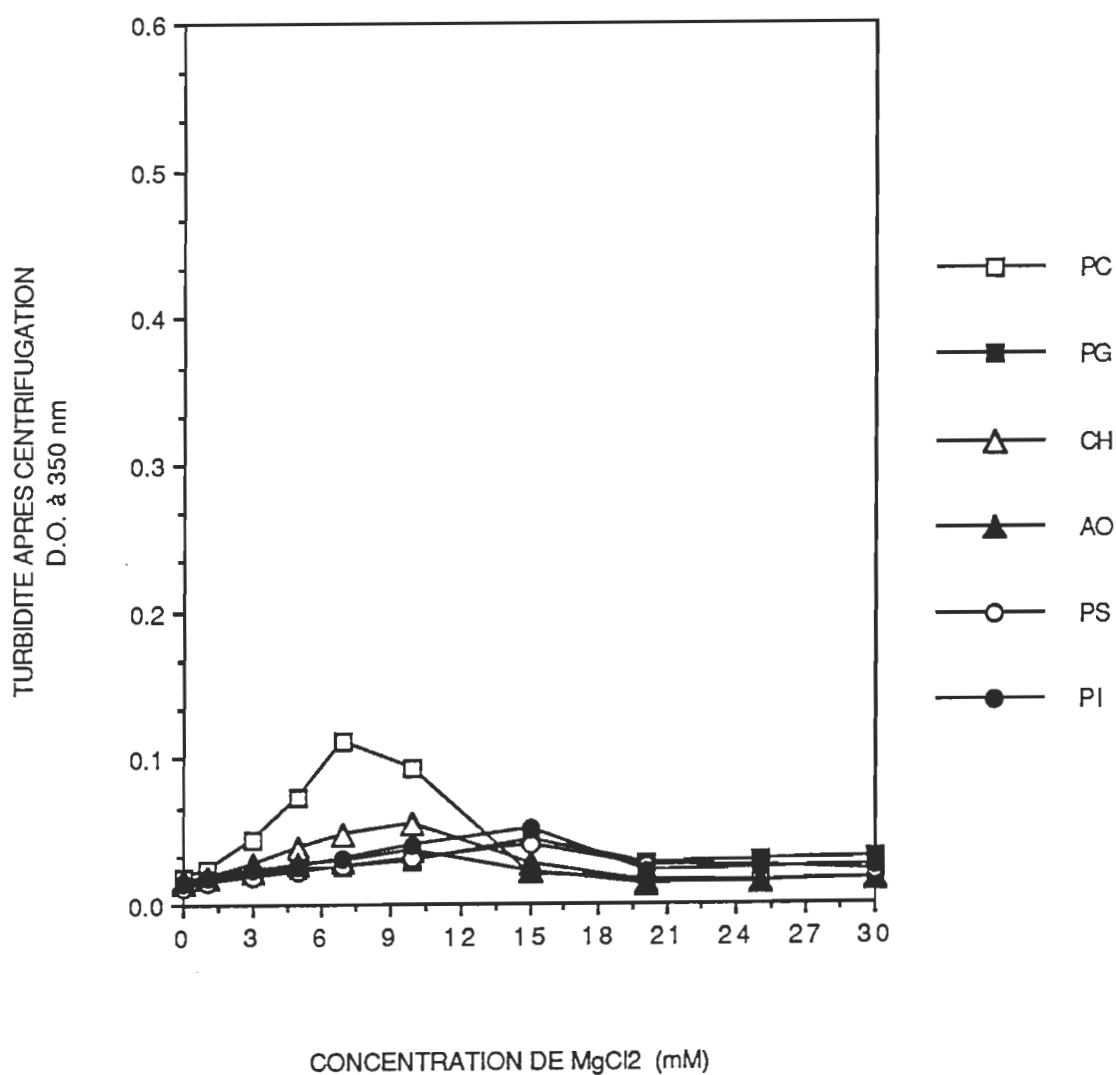


Figure 18. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-G-liposomes après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G.

Turbidité des mélanges actine-G-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$



différentielle. L'effet des ions  $Mg^{2+}$  sur la turbidité différentielle de mélanges actine-G-liposomes, est illustré à la figure 19. Les ions  $Mg^{2+}$  ont le même effet que les ions  $Ca^{2+}$  sur l'interaction actine-G-liposomes. A mesure qu'augmente la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ , on remarque une hausse de la turbidité différentielle jusqu'à une concentration de 25 mM. Au-delà de cette concentration, la turbidité différentielle tend à diminuer.

## 2) Interaction entre l'actine-F et les liposomes en présence de cations divalents

### - influence des ions $Ca^{2+}$

L'influence des cations divalents sur l'interaction actine-liposomes a aussi été étudiée avec l'actine-F.

La figure 20 représente les valeurs de turbidité des mélanges actine-F-liposomes avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $Ca^{2+}$ . On remarque une hausse de turbidité à partir d'une concentration de 10 mM d'ions  $Ca^{2+}$  dans le milieu. Cette augmentation reste constante jusqu'à 20 mM d'ions  $Ca^{2+}$  puis la turbidité avant centrifugation atteint un plateau.

On observe, comme avec l'actine-G, qu'en présence de fortes concentrations d'ions  $Ca^{2+}$  supérieures à 10 mM, les solutions d'actine seule deviennent turbides (figure 21). Le phénomène est dû à la paracristallisation

Figure 19. Turbidité différentielle à 350 nm de mélanges actine-G-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml  
Concentration de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G.

Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes (SUV) en  
fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$

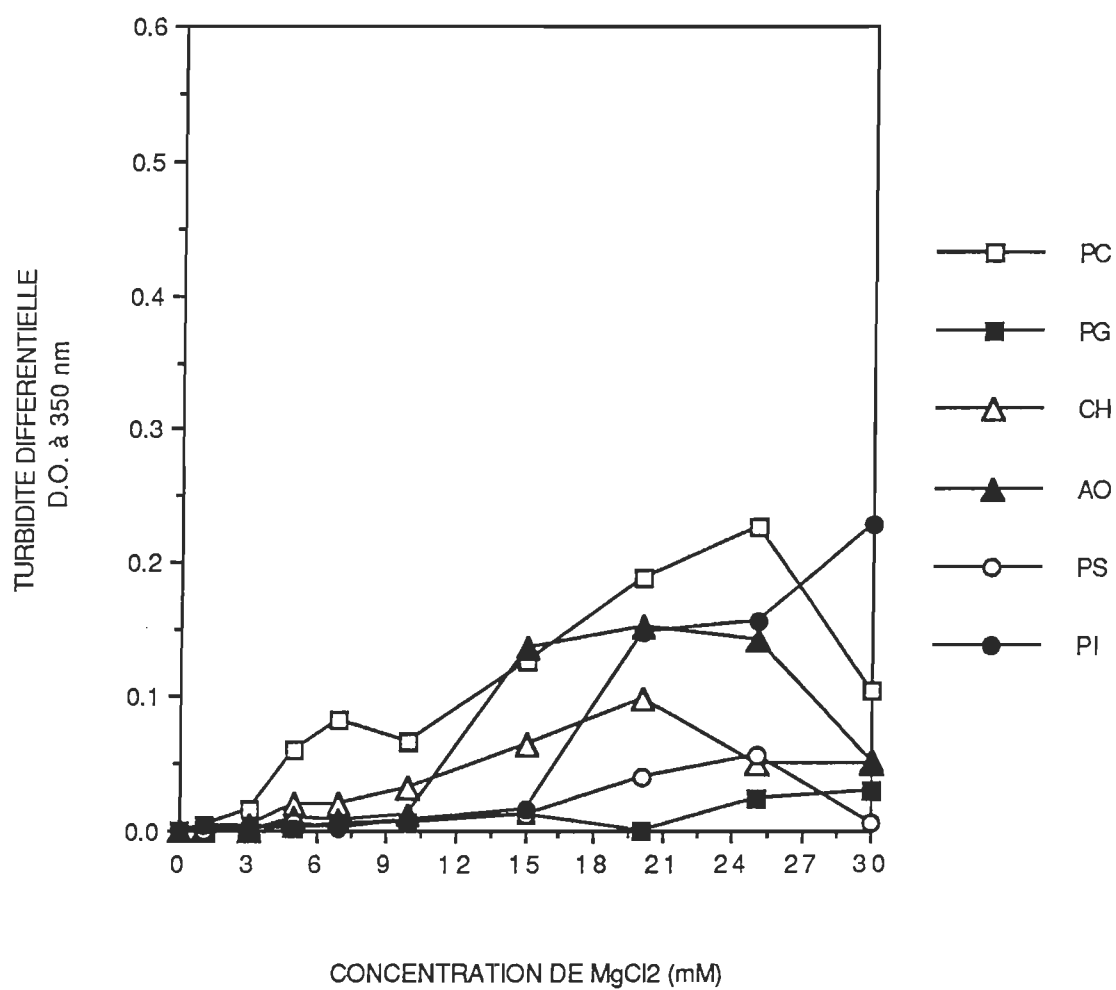


Figure 20. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-F-liposomes avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D.

Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$

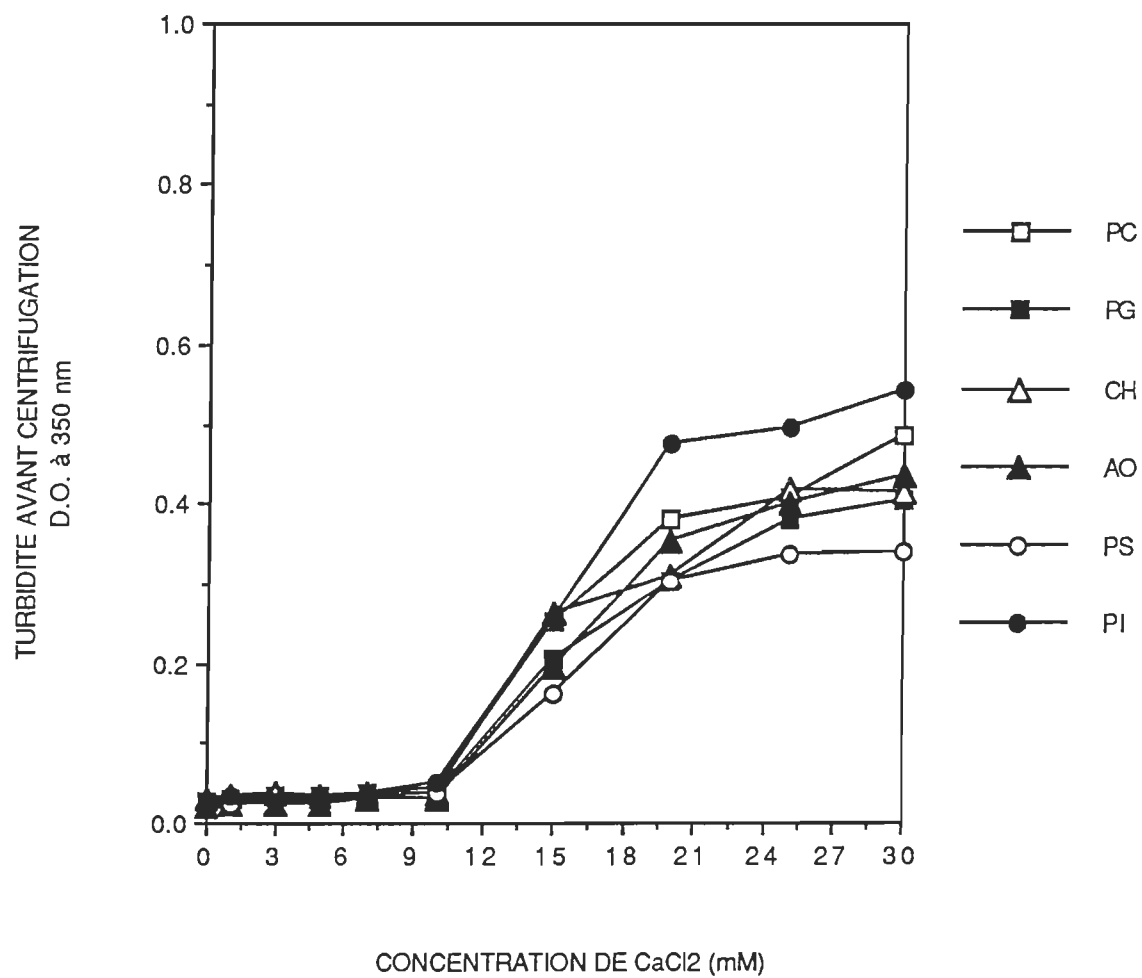
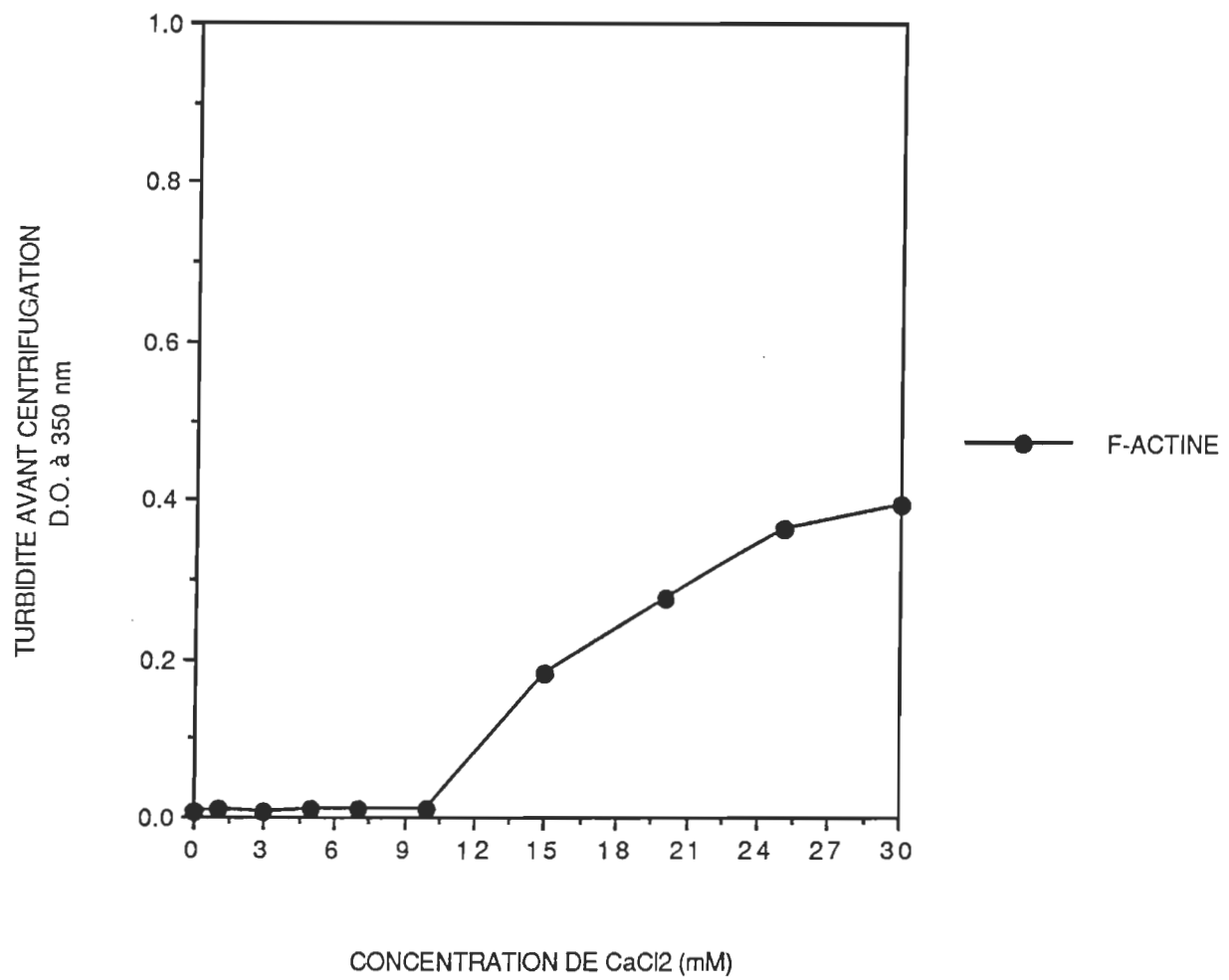




Figure 21. Turbidité à 350 nm de solutions d'actine-F avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml en solution dans le tampon D.

Turbidité de l'actine-F seule en fonction  
de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$



de l'actine-F. Par contre, les solutions de liposomes seuls en présence de concentrations croissantes d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  montrent une turbidité constante quelle que soit la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (figure 22), montrant ainsi que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  n'affectent pas les liposomes.

Les courbes de turbidité après centrifugation des mélanges actine-F-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont illustrées à la figure 23. Les valeurs de turbidité mesurées dans le surnageant demeurent constantes quelle que soit la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

Comme en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'actine forme des paracristaux, les résultats qui suivent sont exprimés en turbidité différentielle. Les courbes de turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont montrées à la figure 24. On observe une hausse de turbidité différentielle pour des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  entre 10 et 20 mM. Pour des concentrations supérieures, les valeurs de turbidité différentielle tendent à diminuer.

#### - influence des ions $\text{Mg}^{2+}$

L'influence des ions  $\text{Mg}^{2+}$  sur l'interaction actine-F-liposomes est illustrée aux figures 25 et 26.

Si on regarde les résultats des figures 25 et 26 qui représentent les valeurs de turbidité des mélanges actine-F-liposomes en fonction de la

Figure 22. Turbidité à 350 nm des différents liposomes avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D

Turbidité des liposomes seuls en fonction  
de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$

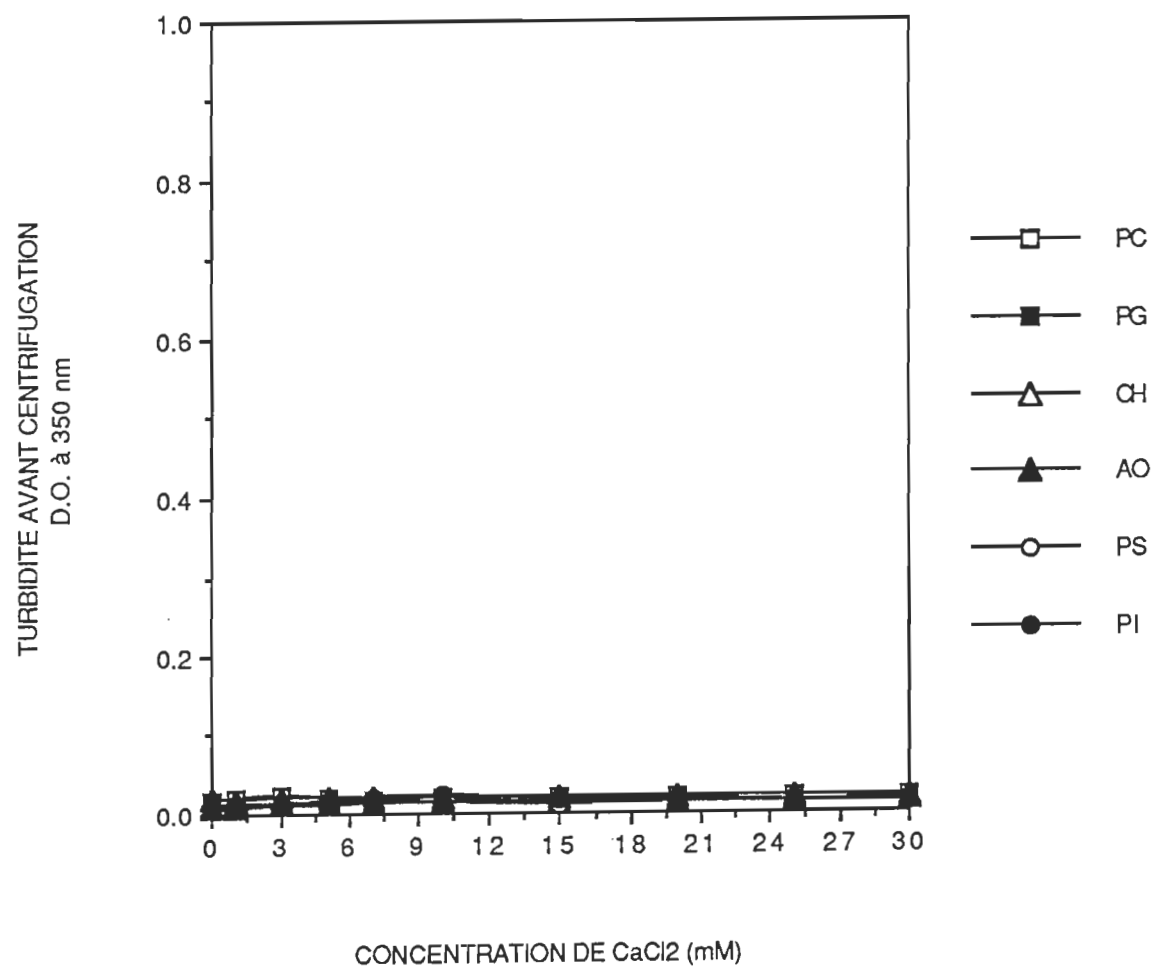


Figure 23. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-F-liposomes après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D.

Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$

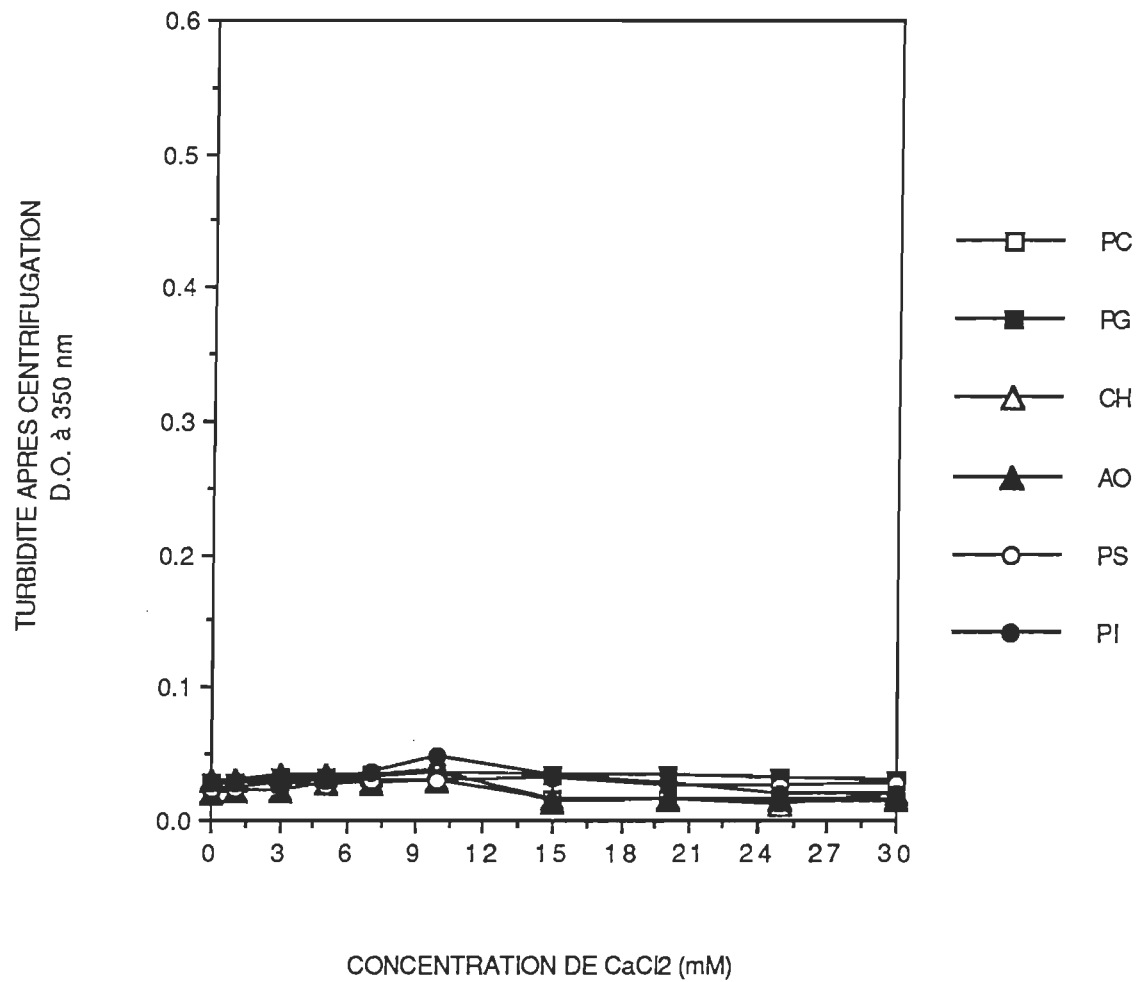
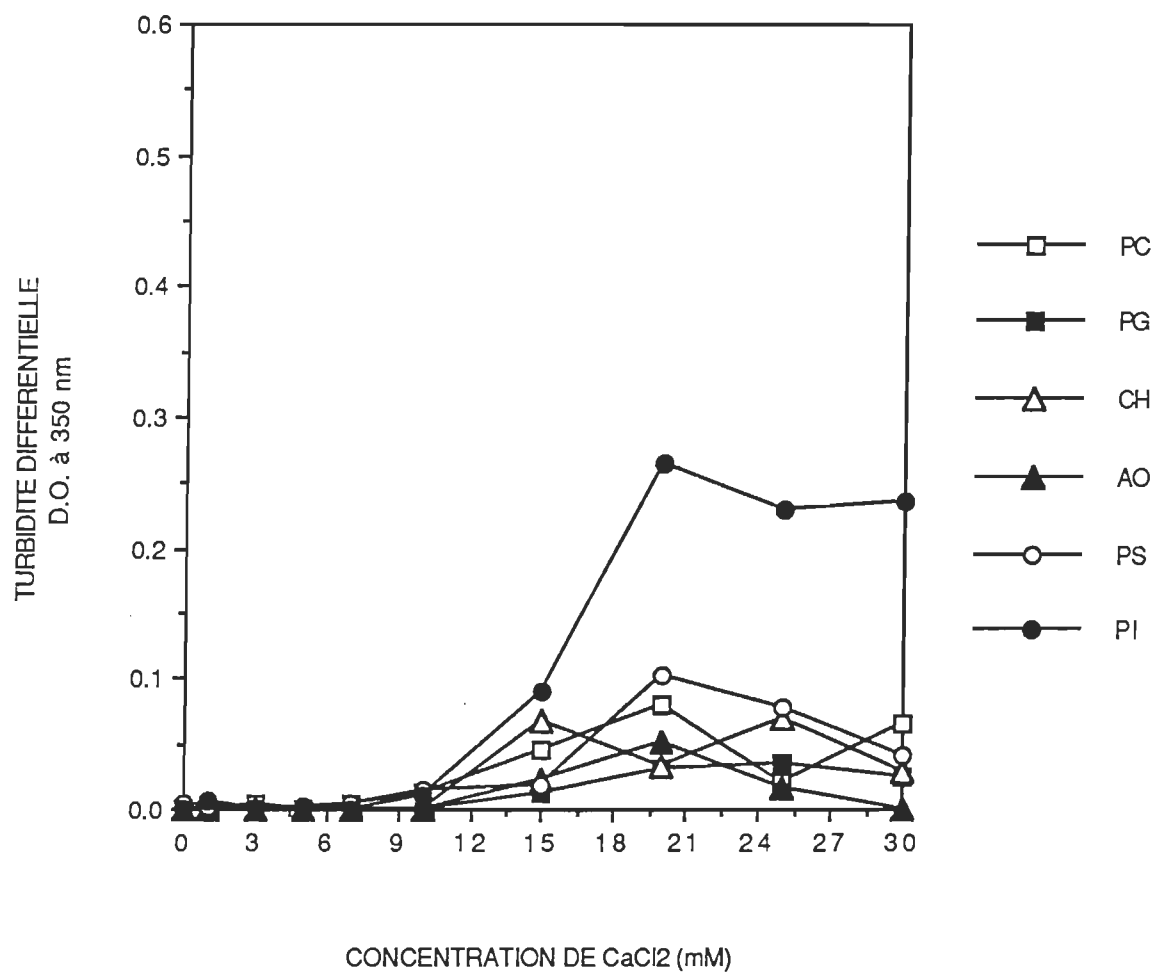


Figure 24. Turbidité différentielle à 350 nm de mélanges actine-F-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D.



Turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes (SUV) en  
fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$



concentration d'ions  $Mg^{2+}$  avant (figure 25) et après (figure 26) centrifugation à 7000g pendant 10 minutes, on remarque qu'il se produit une hausse de turbidité avant centrifugation en présence de 20 mM et plus d'ions  $Mg^{2+}$  dans le milieu.

Les valeurs de turbidité après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes des mélanges actine-F-liposomes sont constantes quelle que soit la concentration d'ions  $Mg^{2+}$  (figure 26).

Comme en présence d'ions  $Mg^{2+}$ , l'actine forme des paracristaux (effet similaire aux ions  $Ca^{2+}$ ), les résultats qui suivent sont exprimés en turbidité différentielle. Les valeurs de turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes sont montrés à la figure 27. Ces valeurs augmentent à partir d'une concentration de 20 mM d'ions  $Mg^{2+}$  mais cette hausse ne se produit pas pour tous les types de liposomes. Elle se produit surtout avec les liposomes neutres et ceux contenant PI.

Tous les résultats présentés précédemment correspondent à une seule et même expérience. Bien entendu, cette expérience a été répétée au moins 2 fois et les résultats obtenus sont reproductibles. Afin de montrer la variabilité des valeurs obtenues, nous avons compilé, à la figure 28, les résultats de 3 expériences faites dans des conditions identiques. Il s'agit de la turbidité différentielle de mélange actine-G-liposomes en fonction de la concentration de  $MgCl_2$ . Chaque point représente une moyenne de 3 valeurs. L'écart-type n'est reproduit que pour les liposomes fabriqués de PC, pour des raisons de clarté graphique, mais est du même ordre de grandeur pour les

Figure 25. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-F-liposomes avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D.

Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) avant centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$

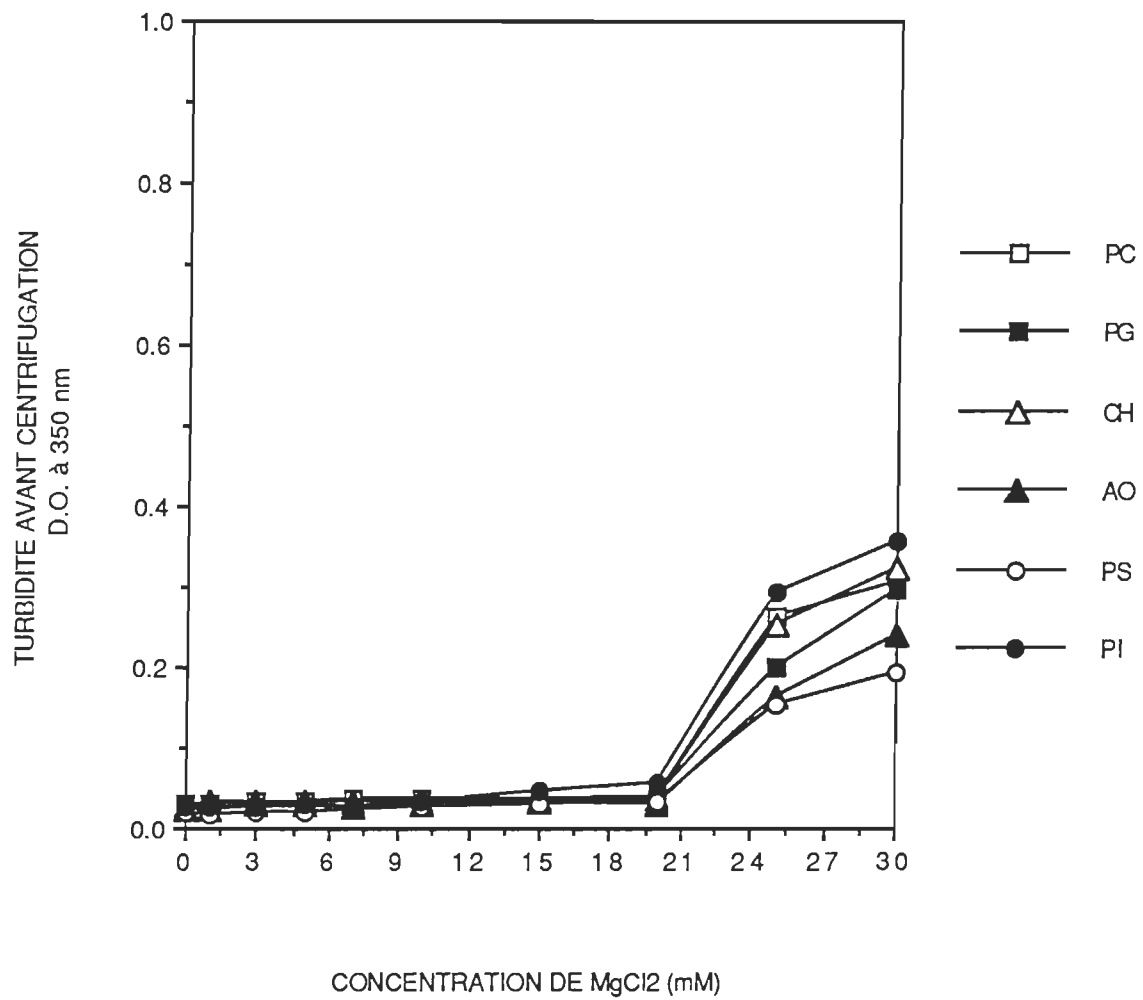


Figure 26. Turbidité à 350 nm des mélanges actine-F-liposomes après centrifugation à 7000g pendant 10 minutes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D.

Turbidité des mélanges actine-F-liposomes (SUV) après centrifugation en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$

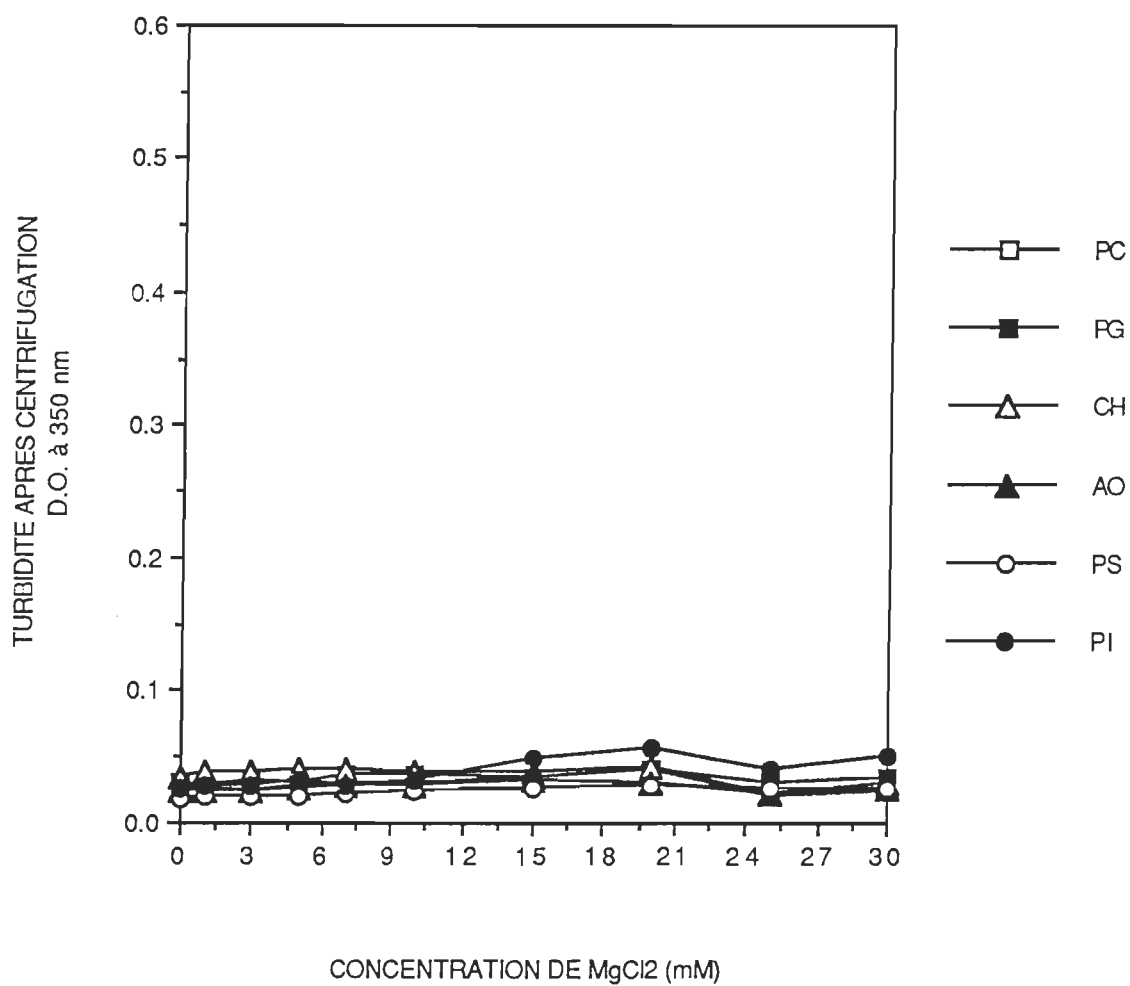


Figure 27. Turbidité différentielle à 350 nm de mélanges actine-F-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides 0.21 mM en solution dans le tampon D.

Turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes (SUV) en  
fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$

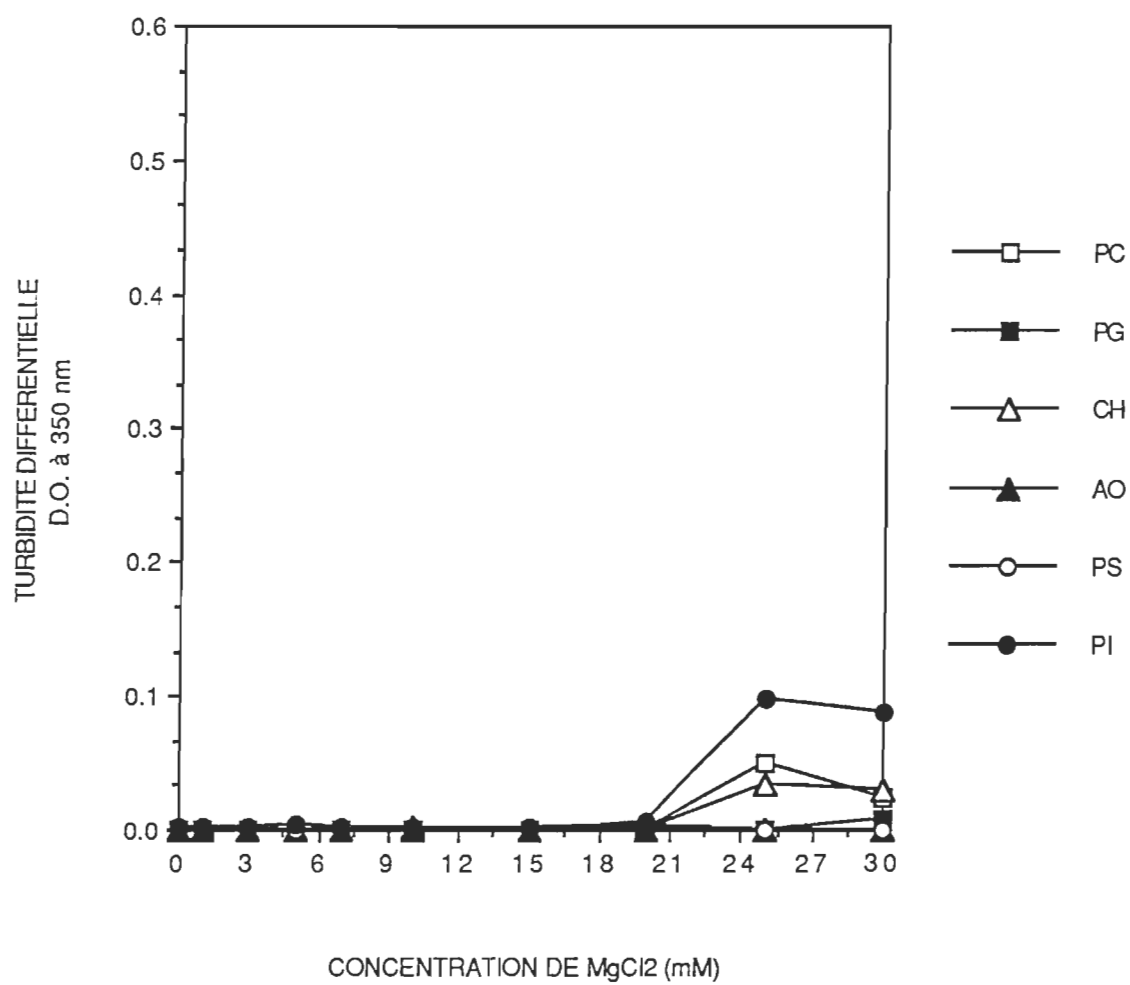
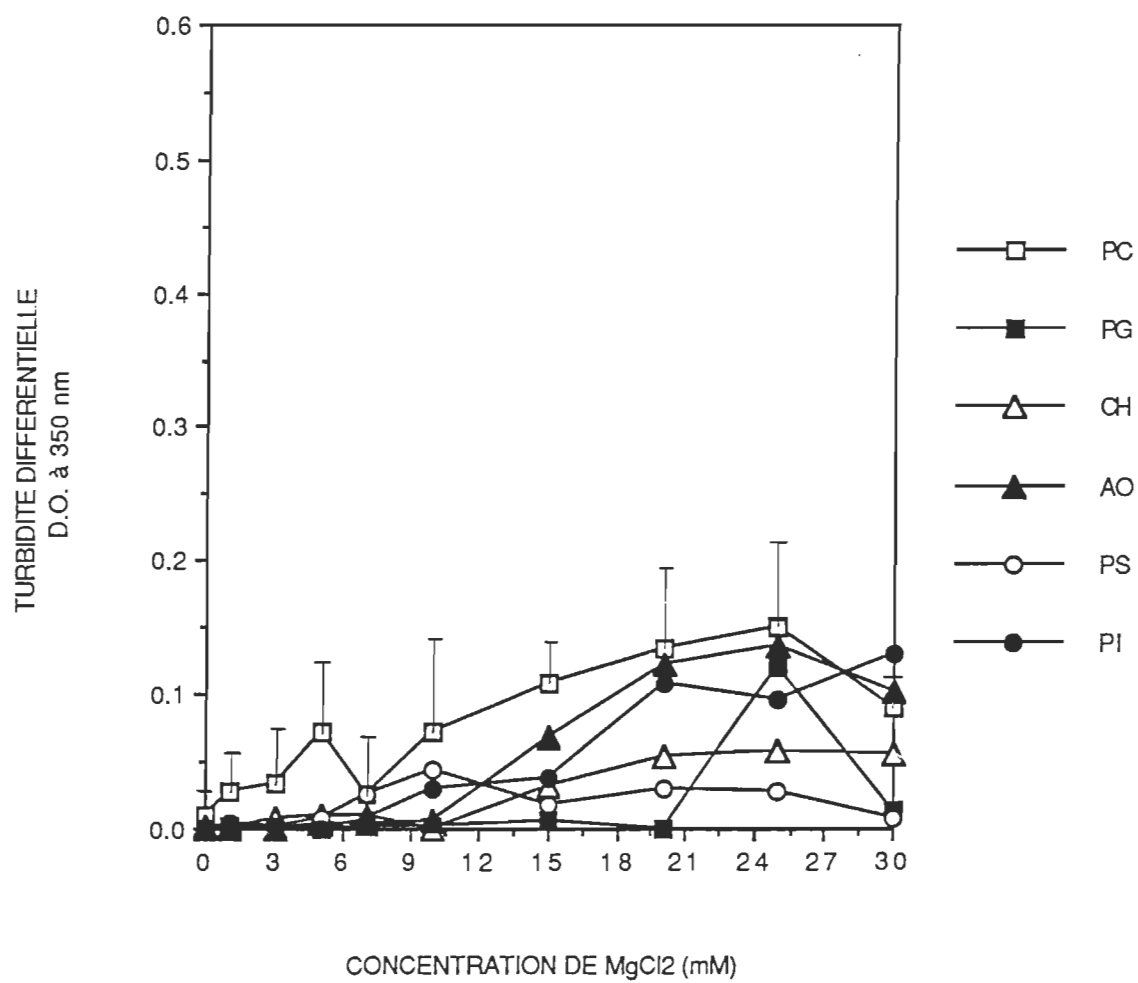




Figure 28: Turbidité différentielle à 350 nm de mélanges actine-G-liposomes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences effectuées dans les mêmes conditions. La déviation standard n'est représentée que pour les mélanges actine-G-liposomes PC, pour des raisons de clarté de graphique. Concentration finale d'actine-G: 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides: 0.21 mM en solution dans le tampon G.

Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes (SUV) en  
fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$



liposomes d'autres compositions. Quoique la déviation standard soit relativement élevée, l'examen de ce graphique montre que la turbidité différentielle du mélange actine-G-liposomes augmente de façon significative en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . De plus, c'est à une concentration de 25 mM de  $MgCl_2$  que l'on observe, pour les mélanges actine-G-liposomes, la valeur de turbidité différentielle la plus élevée.

Les études de l'influence des ions divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  sur l'interaction actine-liposomes nous montrent qu'il se produit une interaction entre l'actine et les liposomes en présence de cations divalents. Cette interaction se traduit par la formation d'agrégats d'actine et de liposomes.

Si on analyse les résultats dans leur ensemble, il est à souligner que les valeurs de turbidité sont plus fortes avec l'actine-G qu'avec l'actine-F. De plus, en comparant les résultats entre l'effet du  $Ca^{2+}$  et du  $Mg^{2+}$ , on note que le calcium est plus efficace que le magnésium car les hausses de turbidité différentielle sont plus importantes. D'autre part, la nature de la tête polaire des lipides ne semble pas influencer sur le phénomène même si dans quelques cas certains lipides montrent une interaction plus prononcée. Nous reviendrons sur ce point au cours de la discussion.

### 3) Interprétation des résultats

L'interaction entre l'actine et les liposomes entraîne la formation d'agrégats. Cet effet est plus accentué pour des concentrations de cations divalents de l'ordre de 10 mM. Nous interprétons ce phénomène comme suit: l'actine possède plusieurs charges négatives et les liposomes utilisés sont tous constitués de phospholipides comportant un groupement phosphate porteur d'au moins une charge négative. L'interaction entre l'actine et les liposomes reposerait donc sur un effet de pontage par les cations divalents entre les charges négatives de l'actine et les charges négatives des liposomes. Cet effet augmente avec la concentration de cations divalents car de plus en plus d'actine et de liposomes sont alors pontés. En présence d'un excès de cations divalents, les sites négatifs de l'actine et des liposomes deviennent saturés. Cette saturation des sites empêche la formation de ponts entre l'actine et les lipides d'où une diminution de la formation d'agrégats.

Cette interprétation est confirmée par le fait que l'interaction est plus faible avec l'actine-F qu'avec l'actine-G. Or, l'actine-F est maintenue sous forme filamenteuse dans un tampon qui contient, en plus, 40 mM d'ions  $K^+$ . Ces ions  $K^+$  peuvent neutraliser des sites anioniques soit de l'actine, soit des liposomes et ainsi diminuer le nombre de pontages possibles.

En conclusion, il n'y a pas d'agrégation entre l'actine et les liposomes de différentes compositions en absence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ . Par contre, des interactions entre l'actine et les liposomes se produisent en présence de cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ .

Nous pensons que le phénomène est de nature électrostatique et résulte de l'établissement de ponts entre les charges négatives de l'actine et des liposomes, par les cations divalents.

## II- Etudes de la perméabilité des liposomes (SUV) à la carboxyfluorescéine

Les techniques de turbidimétrie et de cosédimentation ont permis de mettre en évidence une interaction entre l'actine et les liposomes. Cependant, ces techniques consistent à mesurer la formation d'agrégats entre l'actine et les liposomes. Or, on peut concevoir que, dans certaines conditions, il puisse exister une interaction entre l'actine et les liposomes qui n'entraîne pas la formation d'agrégats. On doit donc utiliser, pour mettre en évidence une telle interaction, d'autres techniques basées sur un principe physique différent.

La mesure de la perméabilité des liposomes est une technique qui a déjà été utilisée pour mettre en évidence une interaction entre des protéines et les liposomes. Cette technique consiste à mesurer la vitesse de sortie d'une substance, ici la carboxyfluorescéine (CF) encapsulée dans des liposomes. Si en présence d'une protéine on note une hausse ou une diminution de la vitesse de sortie de la CF des liposomes, on peut en conclure qu'il existe une interaction protéine-liposome. D'autre part cette technique nous permet de préciser un mécanisme d'interaction actine-lipides. En effet toute hausse de perméabilité des liposomes résulte d'une modification de l'organisation des lipides induite par la protéine.

A) Influence de la concentration d'actine sur la perméabilité des liposomes en absence de cations divalents

1) interaction entre l'actine-G et les liposomes en absence de cations divalents

La figure 29 montre la vitesse de sortie de la CF encapsulée dans des liposomes de compositions différentes, en absence d'actine. La perméabilité des liposomes est très faible en fonction du temps. Pour cette expérience, les liposomes les moins perméables sont ceux contenant 90% PC et 10% PS. Par contre, les plus perméables sont ceux composés de 90% PC et 10 % PI. Les autres types de liposomes laissent sortir la CF à peu près à la même vitesse.

D'après ces résultats, on peut dire qu'en absence d'actine, les liposomes sont peu perméables à la CF.

L'influence de concentrations croissantes d'actine sur la perméabilité des liposomes à la CF est représentée à la figure 30. Lorsque l'on mélange de l'actine-G avec des liposomes de compositions différentes, ceux-ci deviennent de plus en plus perméables à mesure que l'on augmente la concentration d'actine-G. L'effet est cependant moins marqué pour les liposomes constitués de PC:PS (figure 30).

La vitesse de sortie de CF des liposomes augmente jusqu'à une concentration d'actine-G d'environ 0.5 mg/ml. Pour des concentrations supérieures d'actine, il y a saturation et la vitesse de sortie de CF devient constante.

Figure 29. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en absence d'actine. Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans le tampon G.



Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction du temps  
en absence d'actine

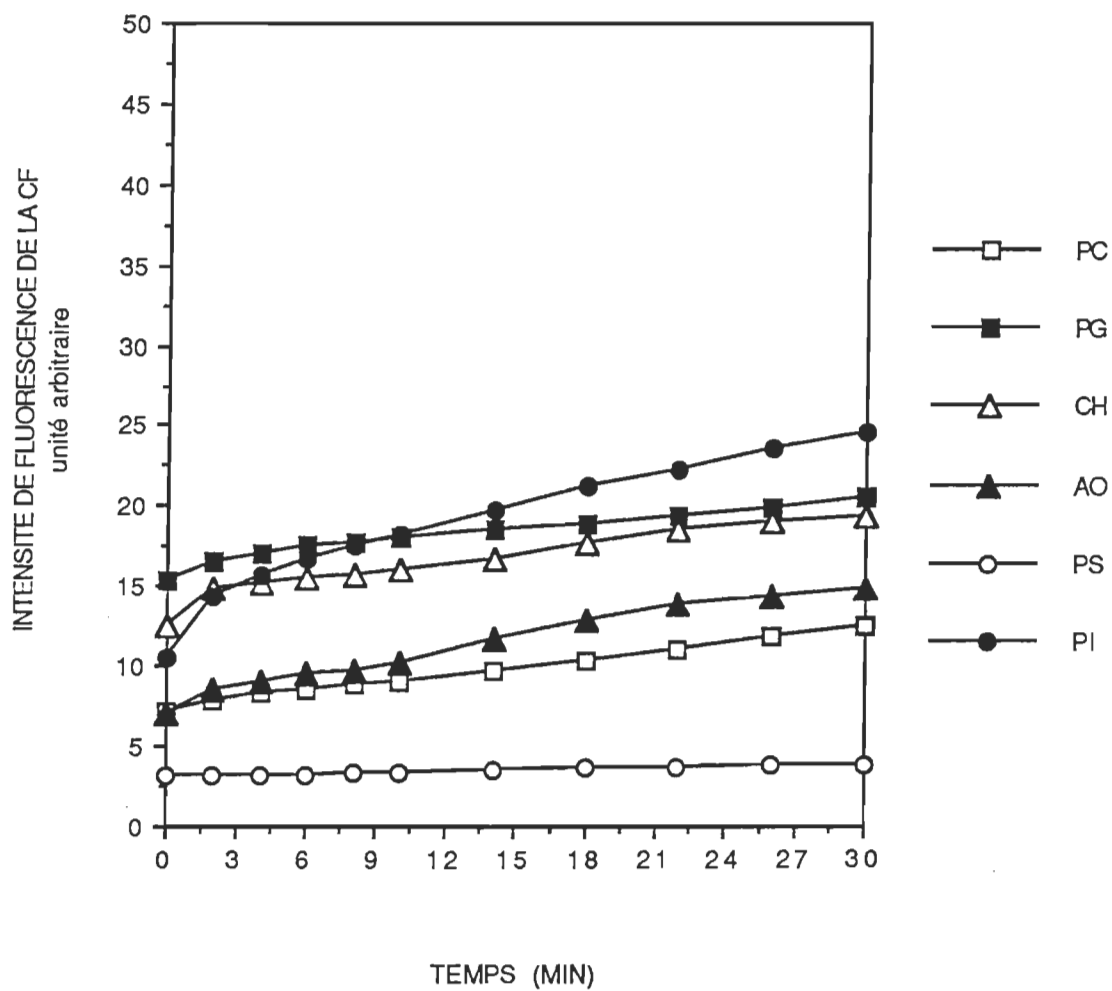
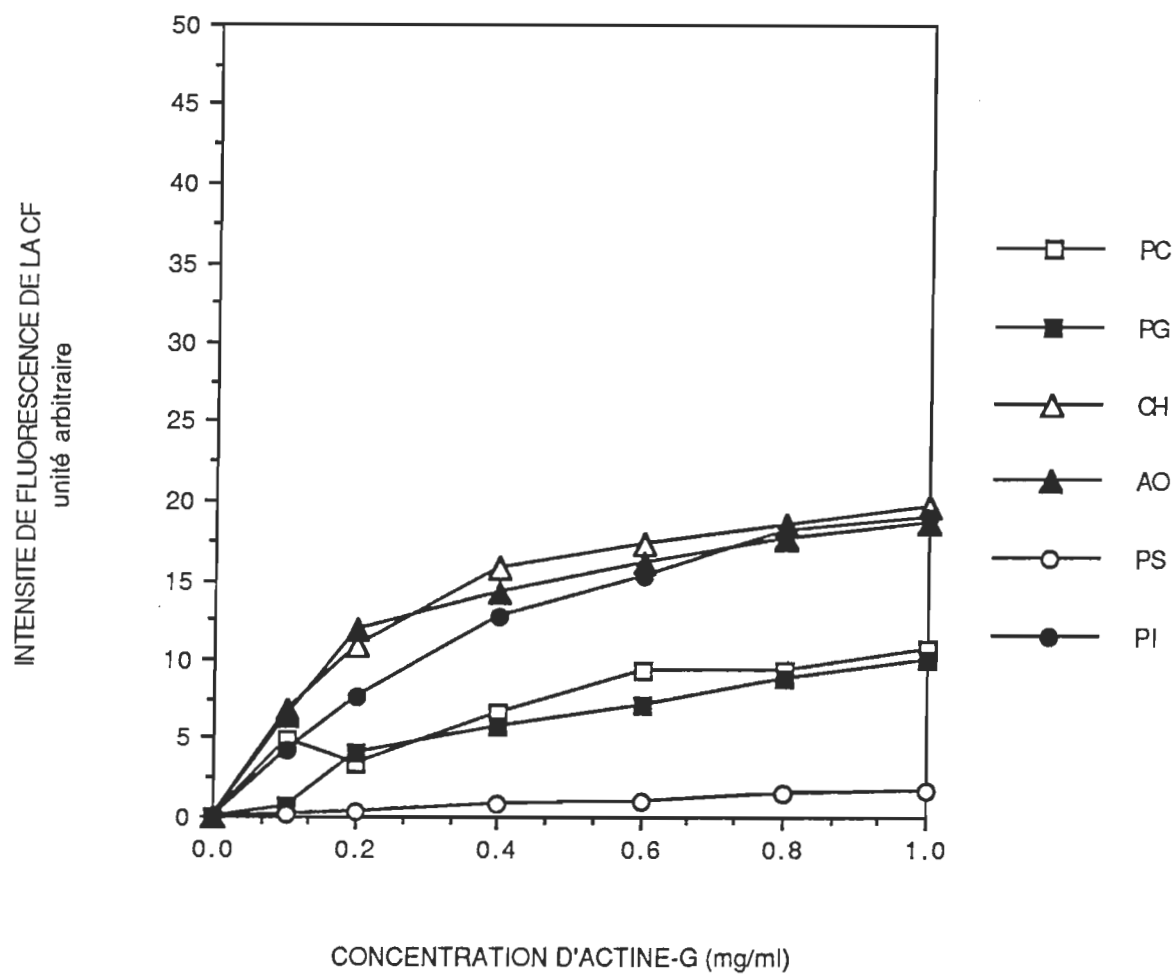


Figure 30. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en fonction de la concentration d'actine-G en absence de cations divalents. Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans du tampon G. Les valeurs représentent la quantité de CF sortie des liposomes après 30 minutes d'incubation.

Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction de la concentration  
d'actine-G en absence de cations divalents



## 2) interaction entre l'actine-F et les liposomes en absence de cations divalents

Les courbes qui représentent la vitesse de sortie de la CF encapsulée dans les liposomes en fonction de la concentration d'actine-F ont un aspect similaire à celles obtenues avec l'actine-G. Cependant, le plateau est obtenu pour de plus basses concentrations d'actine soit 0.1 mg/ml comme le montre la figure 31.

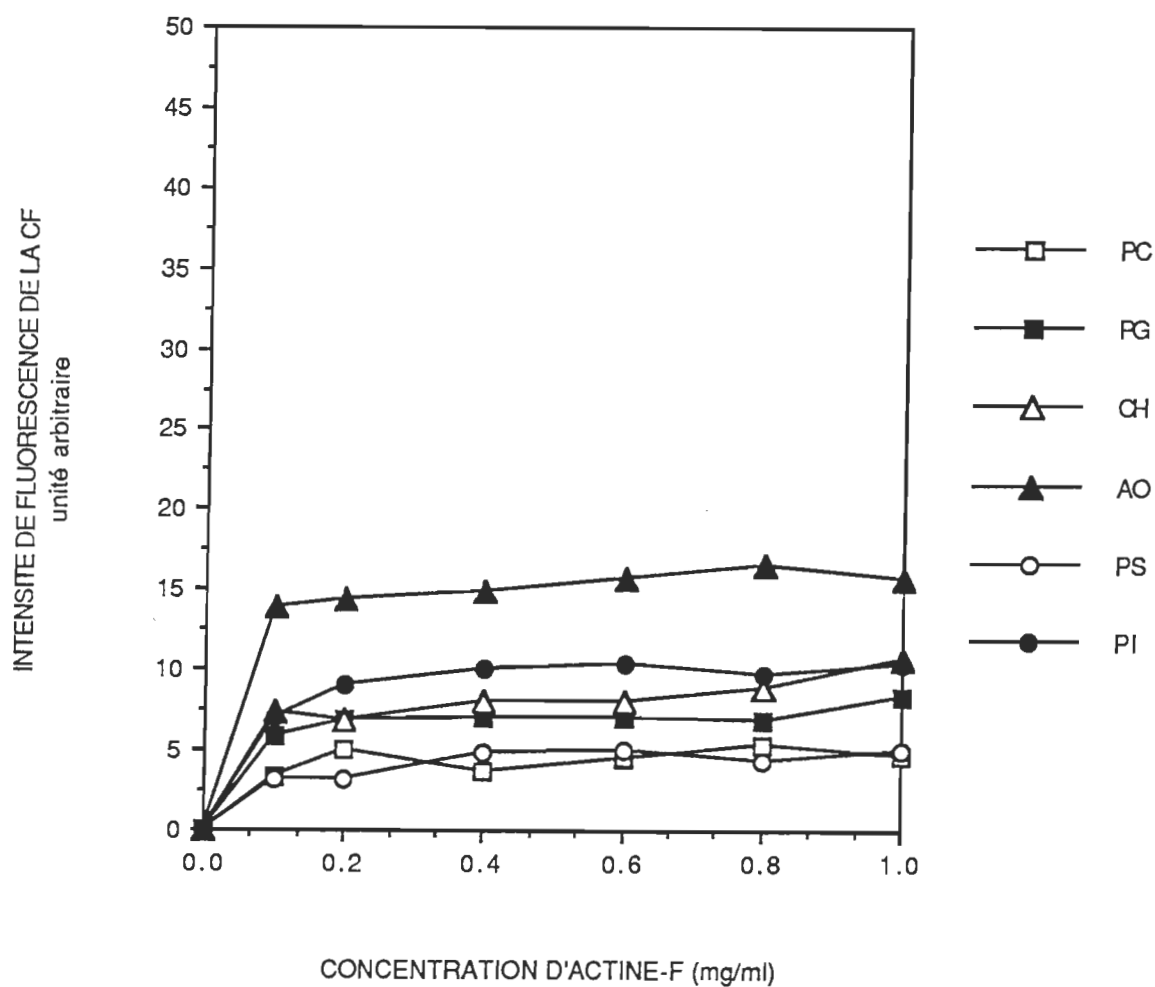
## 3) interprétation des résultats

En absence d'actine, les liposomes sont peu perméables à la CF. Par contre, en présence d'actine, on observe une augmentation de la perméabilité des liposomes. La libération de CF des liposomes provoquée par l'actine-G ne peut résulter que de l'interaction de l'actine monomérique avec la membrane du liposome. Cette interaction entraîne une perturbation de la bicouche qui résulte en une hausse de la perméabilité. Cet effet augmente en fonction de la concentration d'actine mais, à une certaine concentration, la surface des liposomes est complètement recouverte d'actine-G. Il se produit alors un phénomène de saturation et même si on augmente la concentration d'actine, il n'y a pas d'augmentation de l'interaction entre l'actine et les liposomes.

Le phénomène est semblable avec l'actine-F. Cependant la saturation est atteinte pour de plus faibles concentrations d'actine. En effet, dans l'actine-F, chaque monomère est incorporé dans un filament dont la

Figure 31. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en fonction de la concentration d'actine-F en absence de cations divalents. Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans du tampon D. Les valeurs représentent la quantité de CF sortie des liposomes après 30 minutes d'incubation.

Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction de la concentration  
d'actine-F en absence de cations divalents



flexibilité est restreinte. En conséquence, certains monomères ne peuvent être en contact avec les liposomes, ce qui s'observe d'ailleurs au microscope électronique (Voir les résultats de la partie V).

En conclusion, l'actine interagit avec les liposomes. Cette interaction entraîne une perturbation des lipides qui composent le liposome ce qui provoque une hausse de la perméabilité de la membrane. Il est à souligner que, contrairement à ce que nous avons observé en turbidimétrie, cette interaction se produit même en absence de cations divalents.

#### B) Influence des ions $\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ sur l'interaction actine-liposomes par mesure de la perméabilité des liposomes à la CF

##### 1) interaction entre l'actine-G et les liposomes en présence de cations divalents

Les figures 32 et 33 montrent l'influence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  sur la sortie de CF des liposomes induite par l'actine-G. De faibles concentrations de cations divalents, de 0 à 3 mM, provoquent une augmentation de la perméabilité des liposomes à la CF induite par l'actine-G. Pour des concentrations supérieures à 5 mM en cations divalents, les valeurs de perméabilité des liposomes à la CF restent constantes ou diminuent faiblement.

Les résultats obtenus sont similaires pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (figure 32) et le  $\text{Mg}^{2+}$  (figure 33).

Figure 32. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en présence d'actine-G en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans le tampon G. Les valeurs représentent la quantité de CF sortie des liposomes après 30 minutes d'incubation.



Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction de la concentration  
d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  en présence d'actine-G

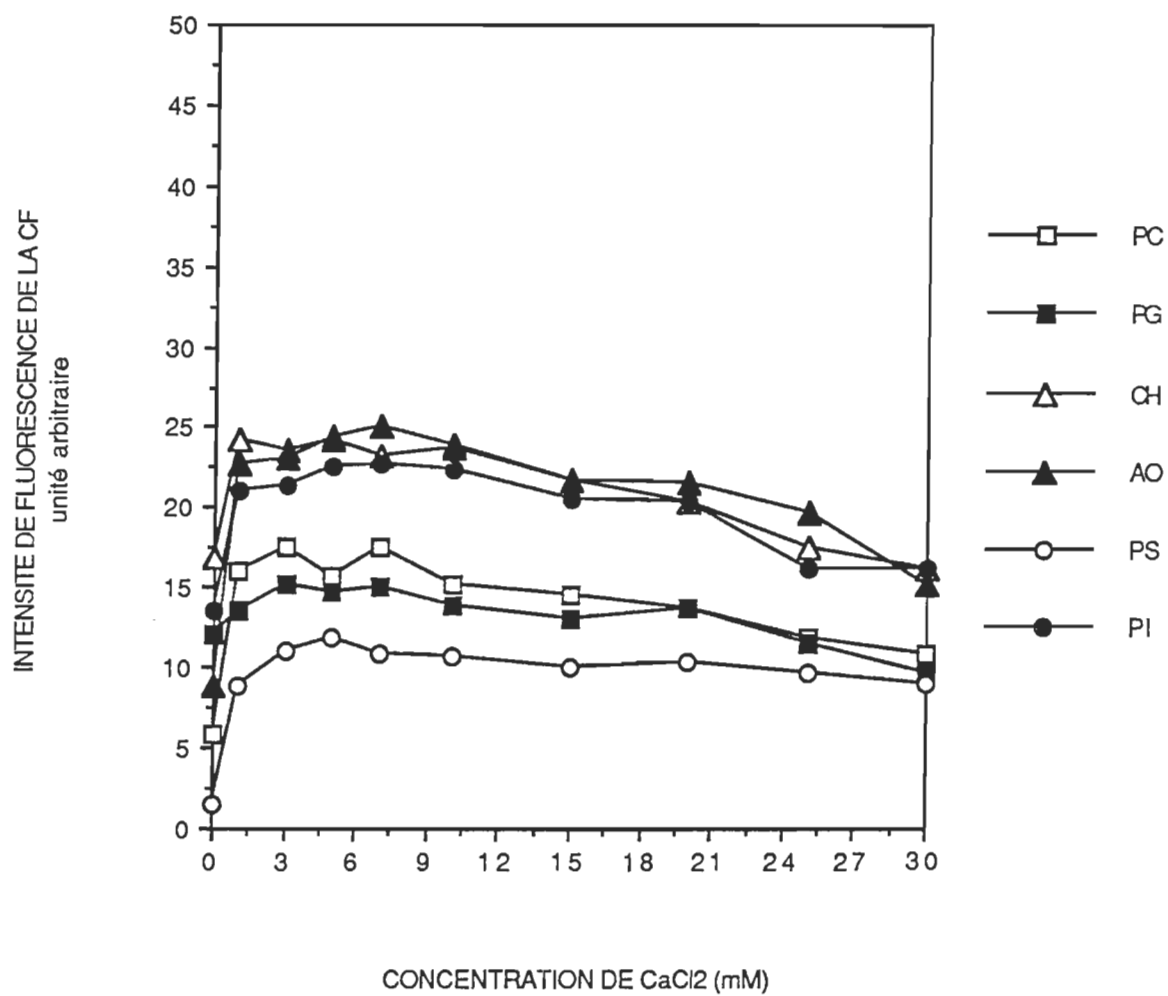
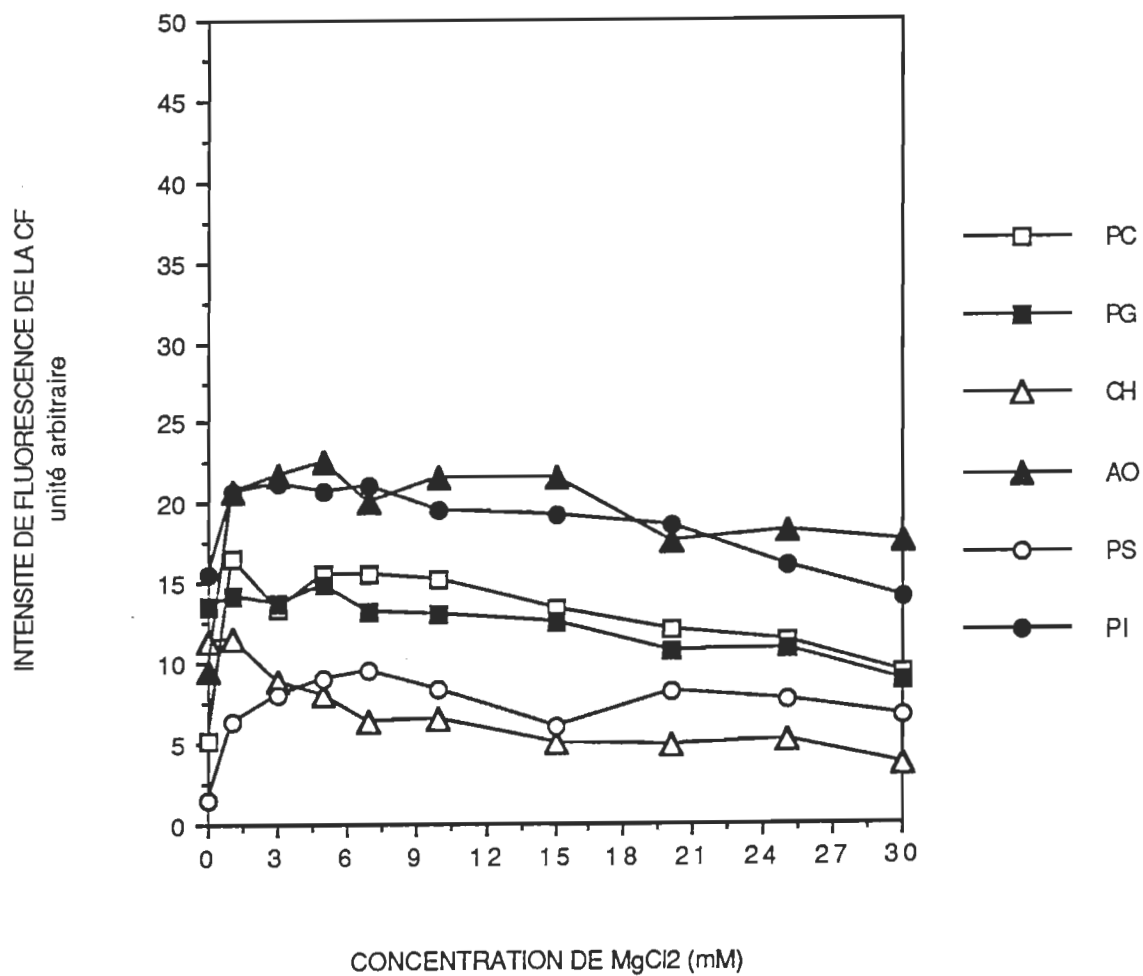


Figure 33. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en présence d'actine-G en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans le tampon G. Les valeurs représentent la quantité de CF sortie des liposomes après 30 minutes d'incubation.

Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction de la concentration  
d'ions  $Mg^{2+}$  en présence d'actine-G



Afin de vérifier si l'augmentation de la perméabilité des liposomes à la CF, induite par l'actine-G, à des concentrations de cations divalents entre 0 et 5 mM est statistiquement significative, nous avons utilisé le test de  $t$  apparié. Nous avons comparé la perméabilité des liposomes, en présence d'actine, à 2 concentrations de cations divalents données soit, dans le cas qui nous intéresse, en absence de cations divalents et en présence de 5 mM de cations divalents. Les valeurs de  $t$  calculées équivalent à 5.31 et 2.31 pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$  respectivement. En se référant à la table de Student, les valeurs de  $t$  calculées sont incluses dans les limites de confiance suivantes:  $0.025 < t < 0.05$  pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $0.0005 < t < 0.005$  pour les ions  $\text{Mg}^{2+}$ . Ce test confirme que 5 mM de cations divalents augmente de façon significative la perméabilité des liposomes à la CF, induite par l'actine-G. Cette hausse de la perméabilité des liposomes n'est pas due à l'effet des ions divalents sur les liposomes. Comme on peut le constater à la figure 36, les ions  $\text{Mg}^{2+}$  (et  $\text{Ca}^{2+}$ ) ne provoquent pas d'augmentation de la perméabilité des membranes des liposomes.

## 2) interaction entre l'actine-F et les liposomes en présence de cations divalents

La perméabilité des liposomes à la CF induite par l'actine-F pour des concentrations croissantes d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  est représentée aux figures 34 et 35. Une augmentation de la concentration de cations divalents dans les préparations actine-F-liposomes diminue la perméabilité des liposomes à la CF.

Figure 34. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en présence d'actine-F en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans le tampon D. Les valeurs représentent la quantité de CF sortie des liposomes après 30 minutes d'incubation.

Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction de la concentration  
d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  en présence d'actine-F

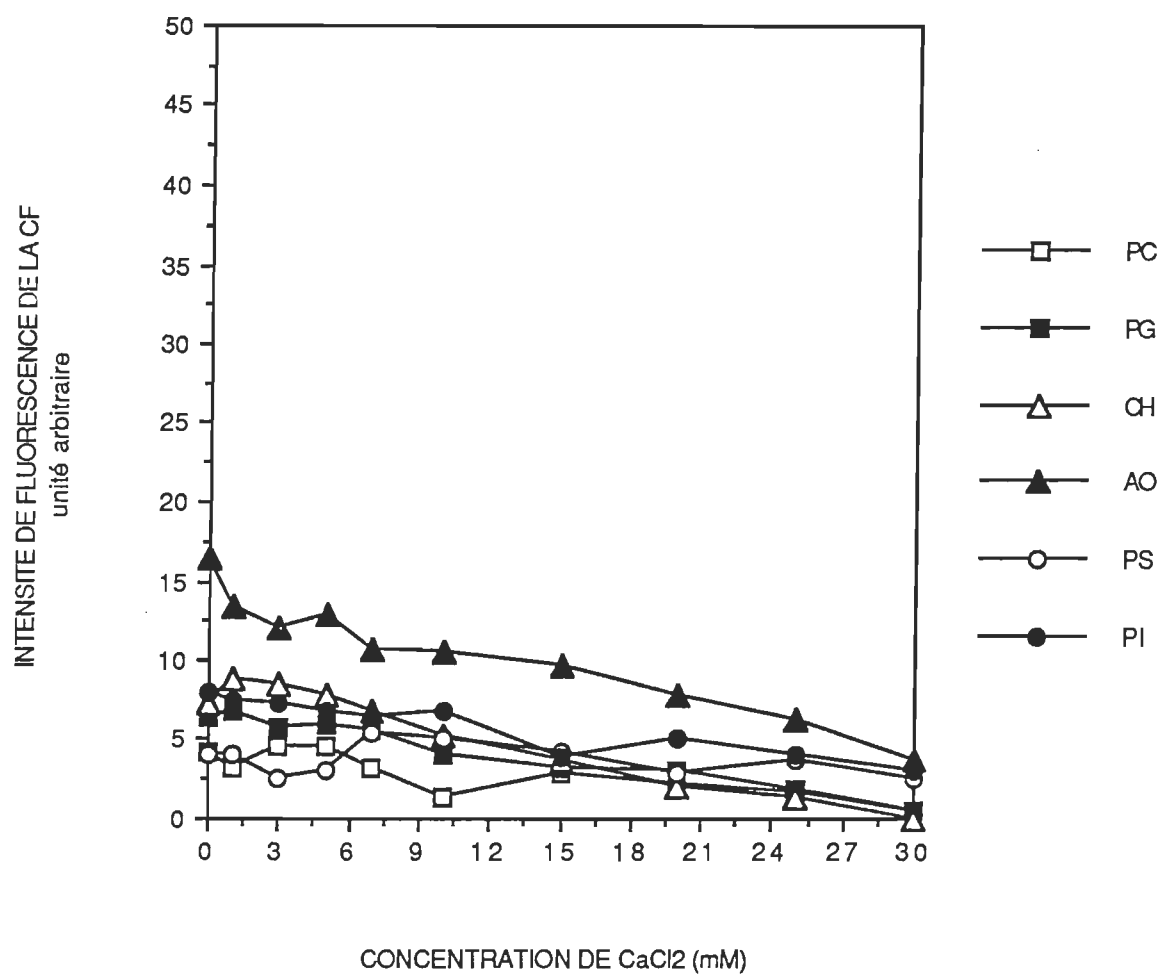
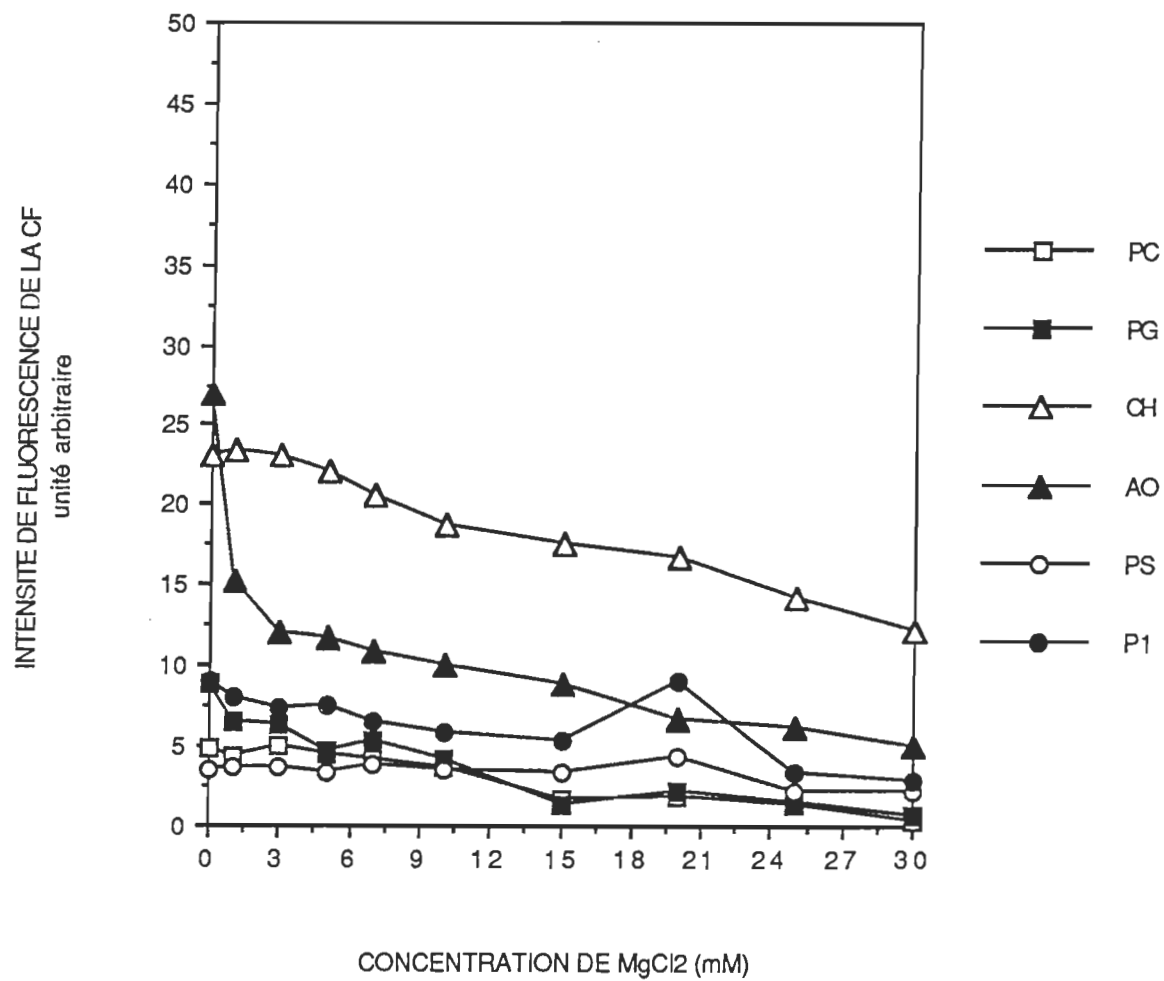


Figure 35. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en présence d'actine-F en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ . Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans le tampon D. Les valeurs représentent la quantité de CF sortie des liposomes après 30 minutes d'incubation.

Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction de la concentration  
d'ions  $Mg^{2+}$  en présence d'actine-F

-110-





Les résultats sont similaires pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (figure 34) et les ions  $\text{Mg}^{2+}$  (figure 35).

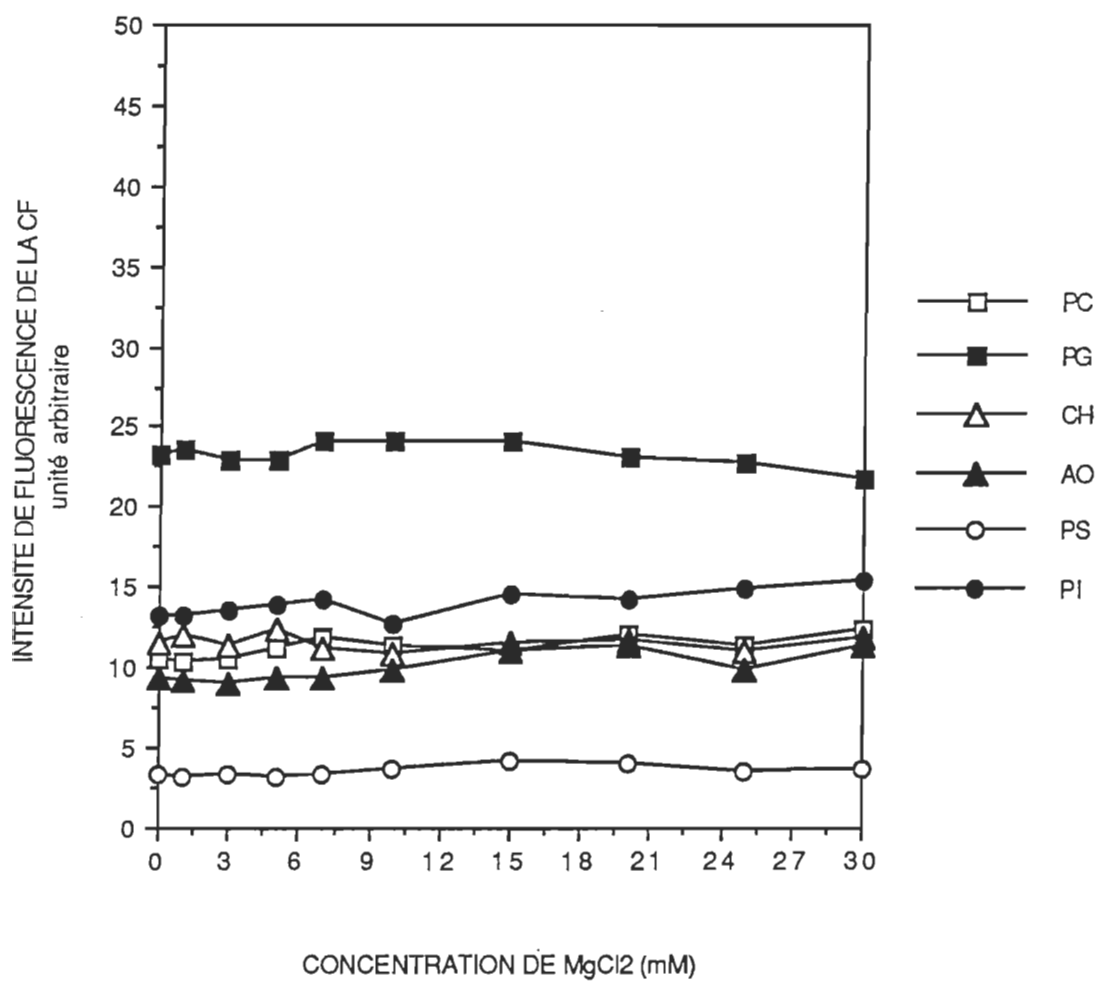
Tout comme pour les mélanges actine-G-liposomes, nous avons fait le test statistique de  $t$  apparié. Les calculs confirment qu'entre 0 et 10 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , il y a une baisse significative de la perméabilité des liposomes à la CF induite par l'actine-F. Dans les deux cas, les limites de confiance sont comprises entre  $0.025 < t < 0.05$ .

On peut se demander si cette influence des cations divalents sur la perméabilité des liposomes est due à la présence d'actine ou simplement à l'action des cations sur les liposomes eux-mêmes. La figure 36 est un témoin qui montre la vitesse de sortie de CF de liposomes, en fonction de la concentration d'ions  $\text{Mg}^{2+}$ , en absence d'actine. On remarque que les valeurs de sortie de CF demeurent constantes en fonction de la concentration de cations divalents, ce qui veut dire que les ions  $\text{Mg}^{2+}$  seuls ne modifient pas la perméabilité des liposomes.

D'autres témoins ont été faits avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et les résultats sont semblables.

Figure 36. Etude de la perméabilité à la CF de liposomes de différentes compositions en absence d'actine en fonction de la concentration de  $Mg^{2+}$ . Concentration finale de lipides de 0.1 mM en solution dans le tampon G. Les valeurs représentent la quantité de CF sortie des liposomes après 30 minutes d'incubation.

Etude de la perméabilité des liposomes (SUV) à la  
carboxyfluorescéine en fonction de la concentration  
d'ions  $Mg^{2+}$  en absence d'actine



Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'actine interagit avec les liposomes, en absence et en présence de cations divalents. En absence de cations divalents, cette interaction provoque une hausse de perméabilité des liposomes. En présence de cations divalents, l'actine-G et l'actine-F produisent l'effet inverse. L'ajout d'actine-G produit une hausse de la perméabilité des liposomes, par contre, l'ajout d'actine-F diminue la perméabilité des liposomes.

Nous en concluons que l'interaction entre l'actine et les liposomes se fait probablement selon 2 mécanismes: une interaction de type électrostatique, sensible à la concentration de cations divalents et qui entraîne la formation d'agrégats entre les liposomes et l'actine; et une interaction de type hydrophobe peu sensible aux cations divalents et qui provoque une hausse de la perméabilité des liposomes à la CF. Nous reviendrons sur ce point au cours de la discussion.

### III- Etude de la fluidité des membranes des liposomes par mesure de la polarisation de fluorescence du DPH

Le DPH est une sonde fluorescente hydrophobe qui se loge au niveau des chaînes aliphatiques des lipides. Il est possible de mesurer la fluidité des membranes, c'est-à-dire la mobilité des chaînes d'acides gras des lipides en mesurant la mobilité de la sonde par la technique de polarisation de fluorescence. La fluidité ( $f$ ) d'une membrane est donc quantifiée en calculant le degré de polarisation de la sonde ( $P$ ), car  $P$  est proportionnel à  $1/f$ . Ainsi, si la membrane est rigide, la sonde ne bouge presque pas et le degré de polarisation obtenu sera élevé. Par contre, si la membrane est fluide, la sonde devient mobile et le degré de polarisation mesuré est faible.

Le but de cette expérience est de déterminer si l'actine modifie la fluidité des membranes.

#### A) Influence de la concentration d'actine sur la fluidité des liposomes en absence de cations divalents

Les figures 37 et 38 montrent les valeurs du degré de polarisation de la sonde DPH incorporée dans des liposomes de différentes compositions pour des concentrations croissantes d'actine-G (figure 37) ou d'actine-F (figure 38) et ce, en absence de cations divalents.

L'actine-G n'a que peu d'influence sur la polarisation de la sonde DPH incorporée dans la membrane des liposomes puisque les valeurs de polarisation de fluorescence demeurent constantes en fonction de la concentration d'actine-G. Par conséquent, l'actine-G n'influence pas la

Figure 37. Degré de polarisation de fluorescence de la sonde DPH incorporée dans la bicouche de liposomes de différentes compositions en fonction de la concentration d'actine-G en absence de cations divalents. Concentration finale de lipides de 0.15 mM en solution dans le tampon G.

# Influence de la concentration d'actine-G sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence

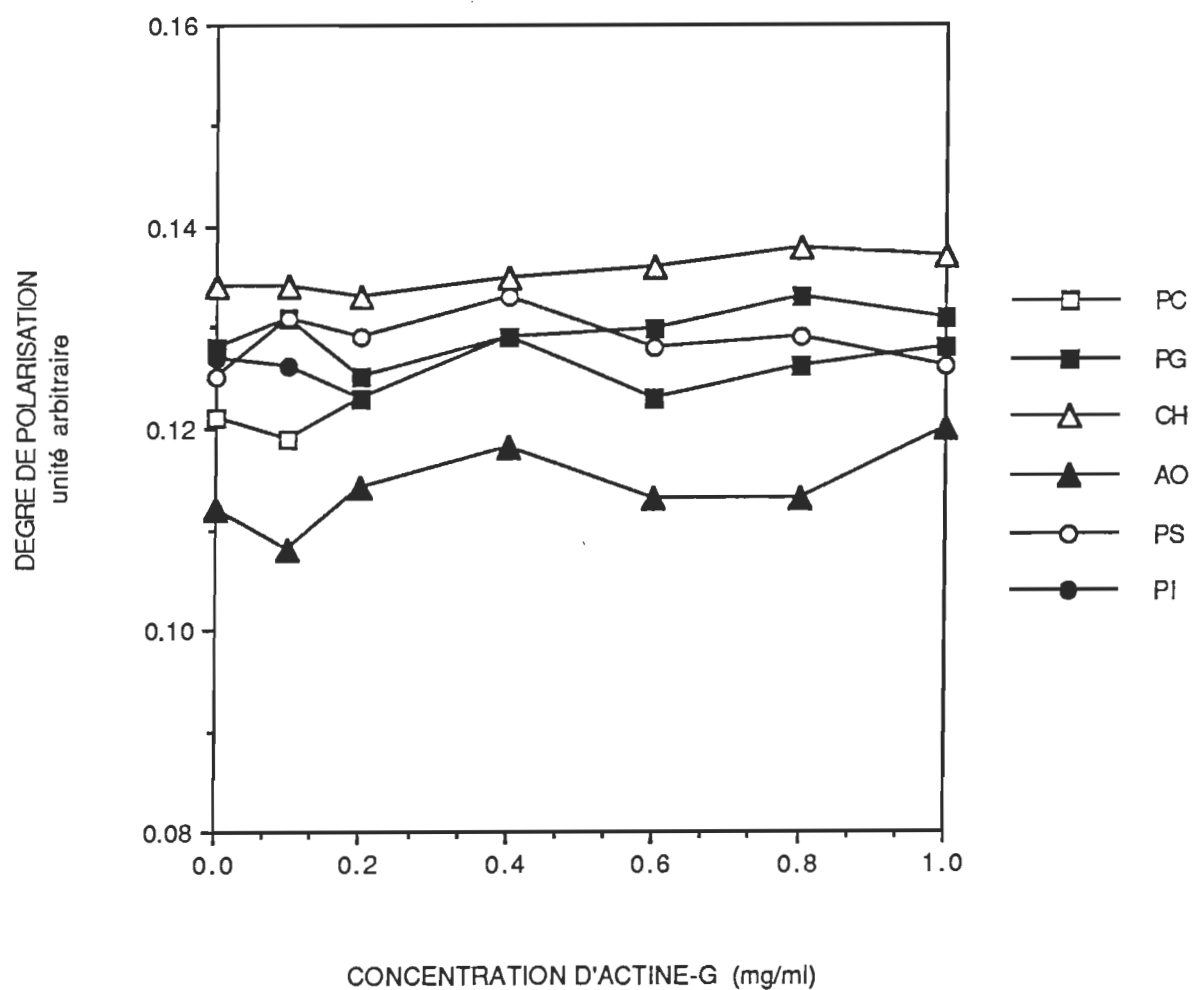
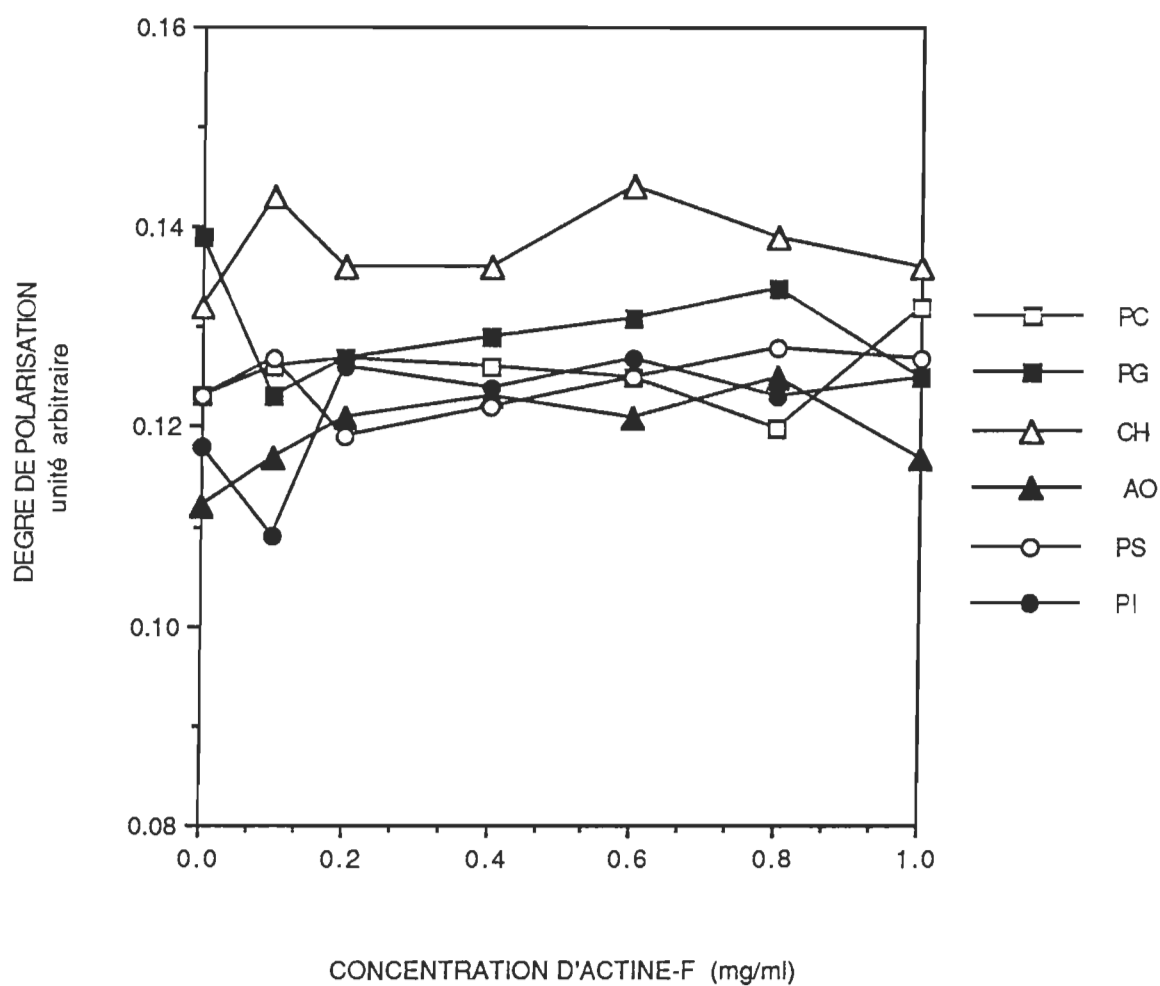


Figure 38. Degré de polarisation de fluorescence de la sonde DPH incorporée dans la bicouche de liposomes de différentes compositions en fonction de la concentration d'actine-F en absence de cations divalents. Concentration finale de lipides de 0.15 mM en solution dans le tampon D



Influence de la concentration d'actine-F sur la fluidité  
des bicouches lipidiques mesurée par  
polarisation de fluorescence



fluidité des lipides qui composent le liposome. Ceci est vrai quelle que soit la nature des lipides.

Les résultats sont semblables avec l'actine-F. Les valeurs du degré de polarisation de la sonde DPH ne varient pas quelle que soit la concentration d'actine-F.

Il faut noter que le degré de polarisation des liposomes contenant du cholestérol est plus élevé que celui des liposomes d'autres compositions. Ceci est dû à l'effet rigidifiant bien connu du cholestérol sur les membranes.

En conclusion, en absence de cations divalents, l'actine-G ou l'actine-F ne modifie pas la fluidité de la bicouche des liposomes et ce quelle que soit la composition de ces liposomes.

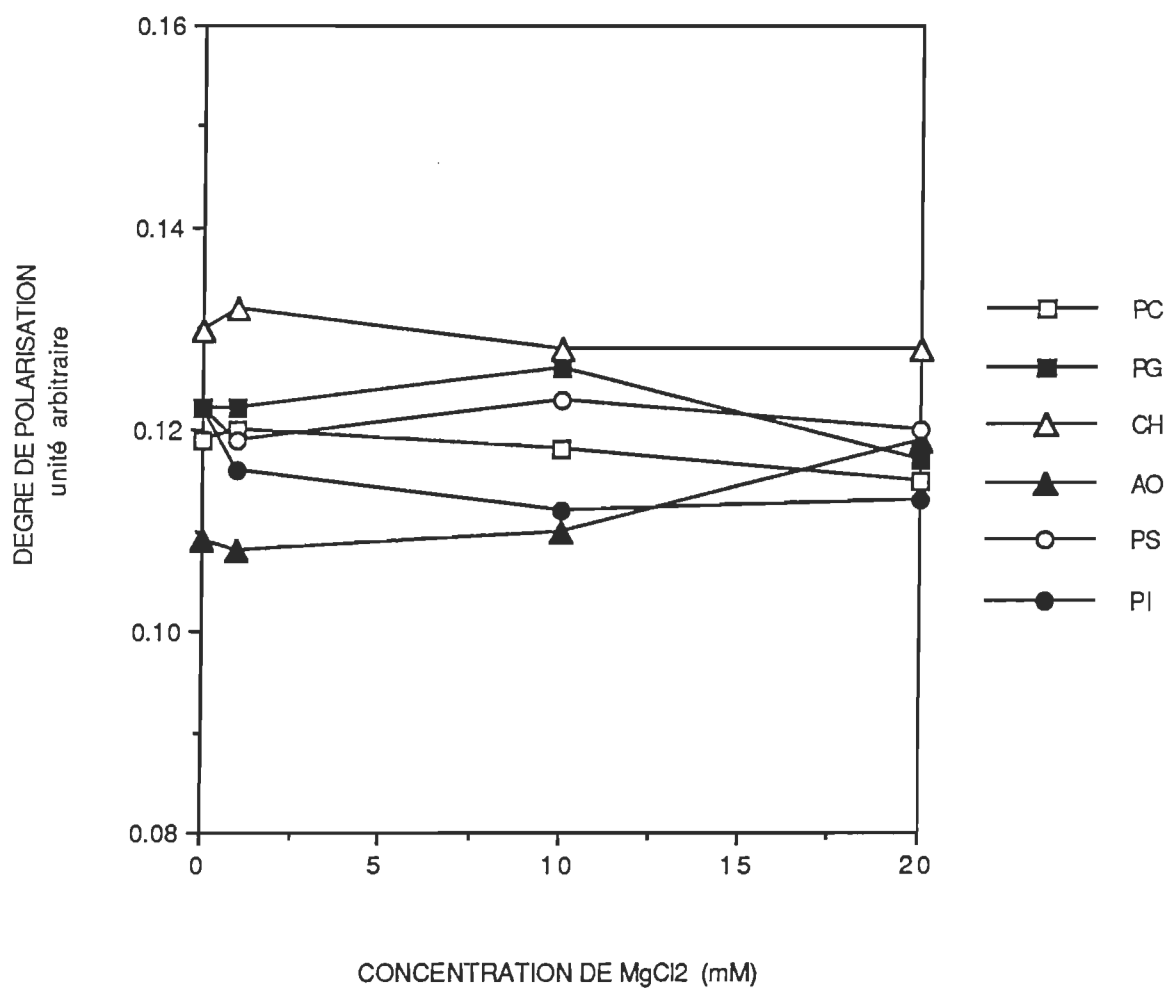
#### B) Influence des ions $\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ sur l'interaction actine-liposomes mesurée par polarisation de fluorescence de la sonde DPH

##### 1) influence des cations divalents sur les liposomes seuls

Les valeurs du degré de polarisation de la sonde DPH incorporée dans la bicouche lipidique de liposomes de différentes compositions en fonction de la concentration d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  sont représentées à la figure 39. L'aspect des courbes montre que les ions  $\text{Mg}^{2+}$  seuls n'affectent pas la fluidité des liposomes puisque les valeurs du degré de polarisation demeurent constantes quelle que soit la concentration de  $\text{Mg}^{2+}$ .

Figure 39. Degré de polarisation de la sonde DPH incorporée dans la bicouche de liposomes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ , en absence d'actine. Concentration finale de lipides de 0.15 mM en solution dans le tampon G.

# Influence des ions $Mg^{2+}$ sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence en absence d'actine



Les mêmes témoins ont aussi été faits avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , et les résultats obtenus sont semblables.

## 2) interaction entre l'actine-G et les liposomes

L'ajout de concentrations croissantes d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à un mélange d'actine-G-liposomes marqués au DPH cause une modification du degré de polarisation de la sonde. A la figure 40, on remarque qu'il y a une diminution du degré de polarisation de la sonde lorsqu'on augmente la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette observation est statistiquement significative (test de  $t$  apparié). Nous avons comparé le degré de polarisation de la sonde dans les mélanges actine-liposomes en absence et en présence de 20 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . La valeur de  $t$  calculée se situe dans des limites de confiance acceptables soit  $0.005 < t < 0.01$ . Nous pouvons donc en conclure qu'en présence de cations divalents, l'actine-G vient perturber la bicouche des liposomes.

Par contre, l'effet des ions  $\text{Mg}^{2+}$  sur la fluidité membranaire est moins évidente dans le mélange actine-G-liposomes. Comme on peut le voir à la figure 41, le degré de polarisation de la sonde semble diminuer en fonction de la concentration de  $\text{MgCl}_2$  mais il s'agit d'une observation subjective. Le test statistique de  $t$  apparié nous donne une valeur de  $t$  calculée située entre  $0.10 < t < 0.15$ , c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative des valeurs de polarisation de fluorescence des mélanges actine-liposomes en absence et en présence de 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Les ions  $\text{Mg}^{2+}$  sont donc moins efficaces que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui confirme les résultats précédents obtenus par turbidimétrie.

Figure 40. Degré de polarisation de la sonde DPH incorporée dans la bicouche de liposomes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , en présence d'actine-G. Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale des lipides, 0.15 mM en solution dans le tampon G.

Influence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur la fluidité des bicouches lipidiques  
mesurée par polarisation de fluorescence  
en présence d'actine-G

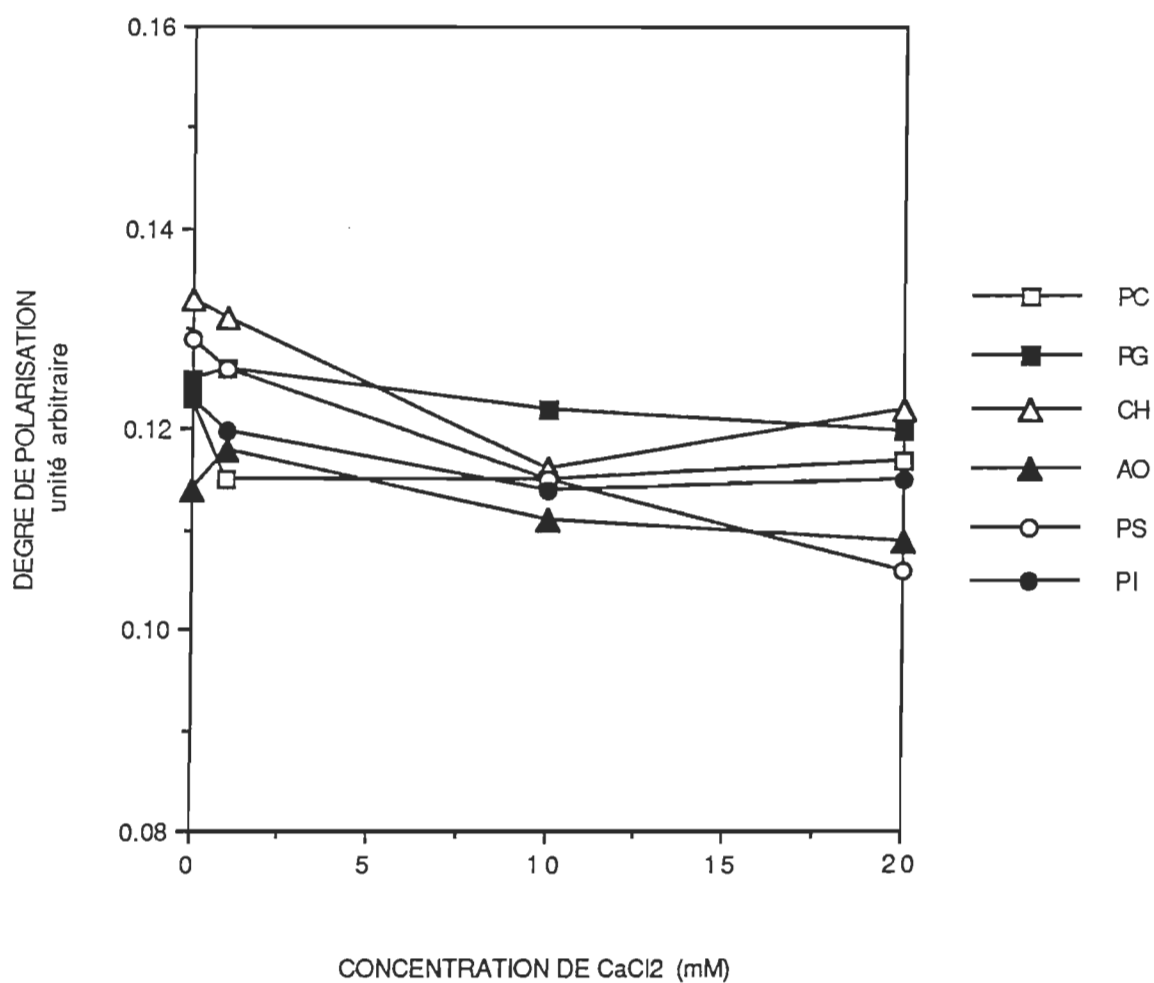
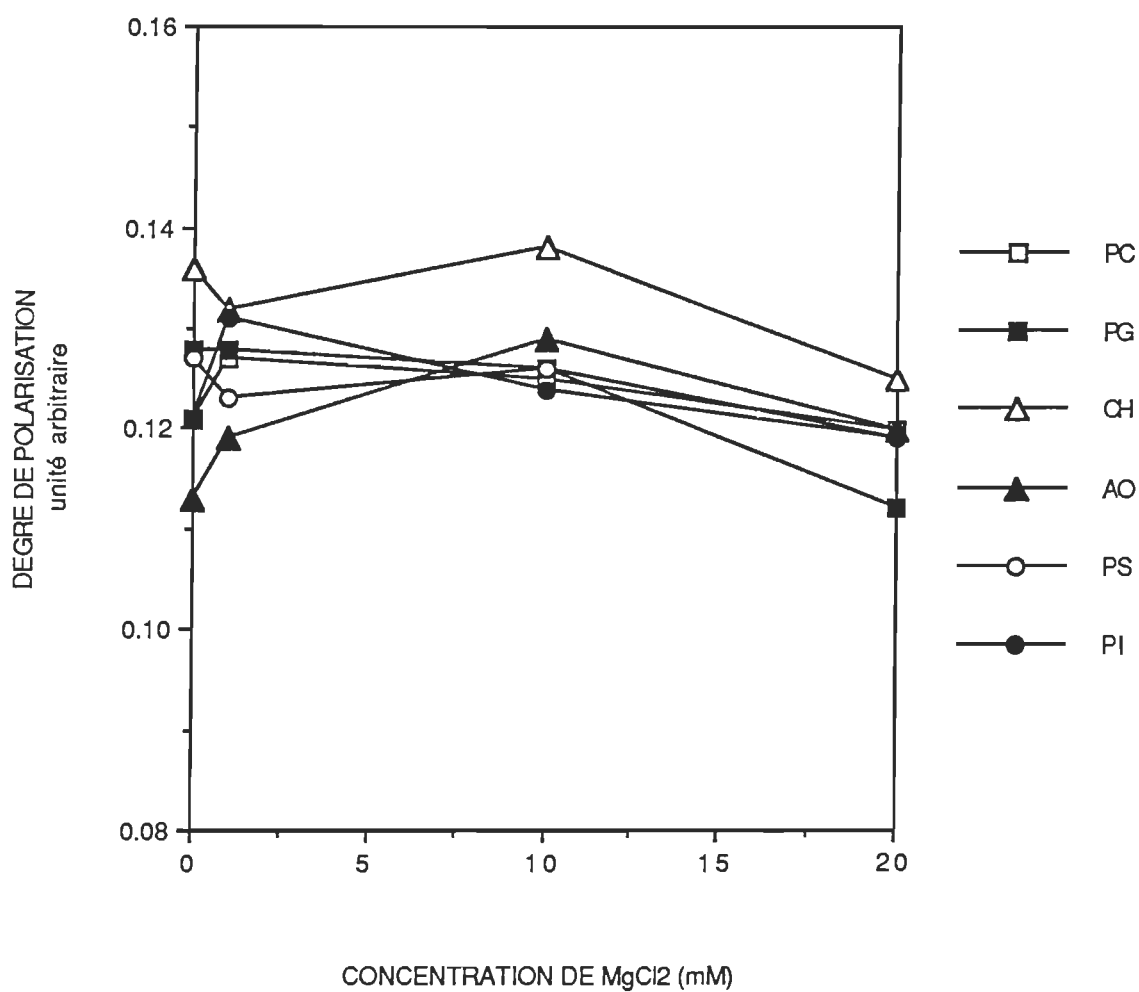


Figure 41. Degré de polarisation de la sonde DPH incorporée dans la bicouche de liposomes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ , en présence d'actine-G. Concentration finale d'actine-G de 0.3 mg/ml. Concentration finale des lipides, 0.15 mM en solution dans le tampon G.



# Influence des ions $Mg^{2+}$ sur la fluidité des bicouches lipidiques mesurée par polarisation de fluorescence en présence d'actine-G



### 3) interaction entre l'actine-F et les liposomes

Le degré de polarisation de la sonde DPH incluse dans des liposomes de différentes compositions, en présence d'actine-F a été mesurée en fonction de la concentration de cations divalents. Les résultats sont présentés aux figures 42 et 43.

En présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , on note une diminution du degré de polarisation de la sonde lorsque la concentration de  $\text{CaCl}_2$  augmente dans le milieu. Ainsi, l'actine modifie la fluidité de la bicouche des liposomes en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Par le test statistique de  $t$  apparié, la valeur de  $t$  que nous avons calculé, est dans les limites de confiance comprises entre  $0.0005 < t < 0.005$ , ce qui confirme cette observation.

L'influence de l'actine-F sur la fluidité de la bicouche des liposomes en présence d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  est représentée à la figure 43. On observe une faible diminution du degré de polarisation de la sonde en présence de 1 mM d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  dans le milieu. Le test statistique de  $t$  apparié donne une valeur de  $t$  calculée située entre  $0.10 < t < 0.15$ . Nous concluons qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative de polarisation de fluorescence de la sonde DPH dans les mélanges actine-liposomes en absence et en présence de 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

Figure 42. Degré de polarisation de la sonde DPH incorporée dans la bicouche de liposomes en fonction de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , en présence d'actine-F. Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale des lipides, 0.15 mM en solution dans le tampon D.

Influence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur la fluidité des bicouches lipidiques  
mesurée par polarisation de fluorescence  
en présence d'actine-F

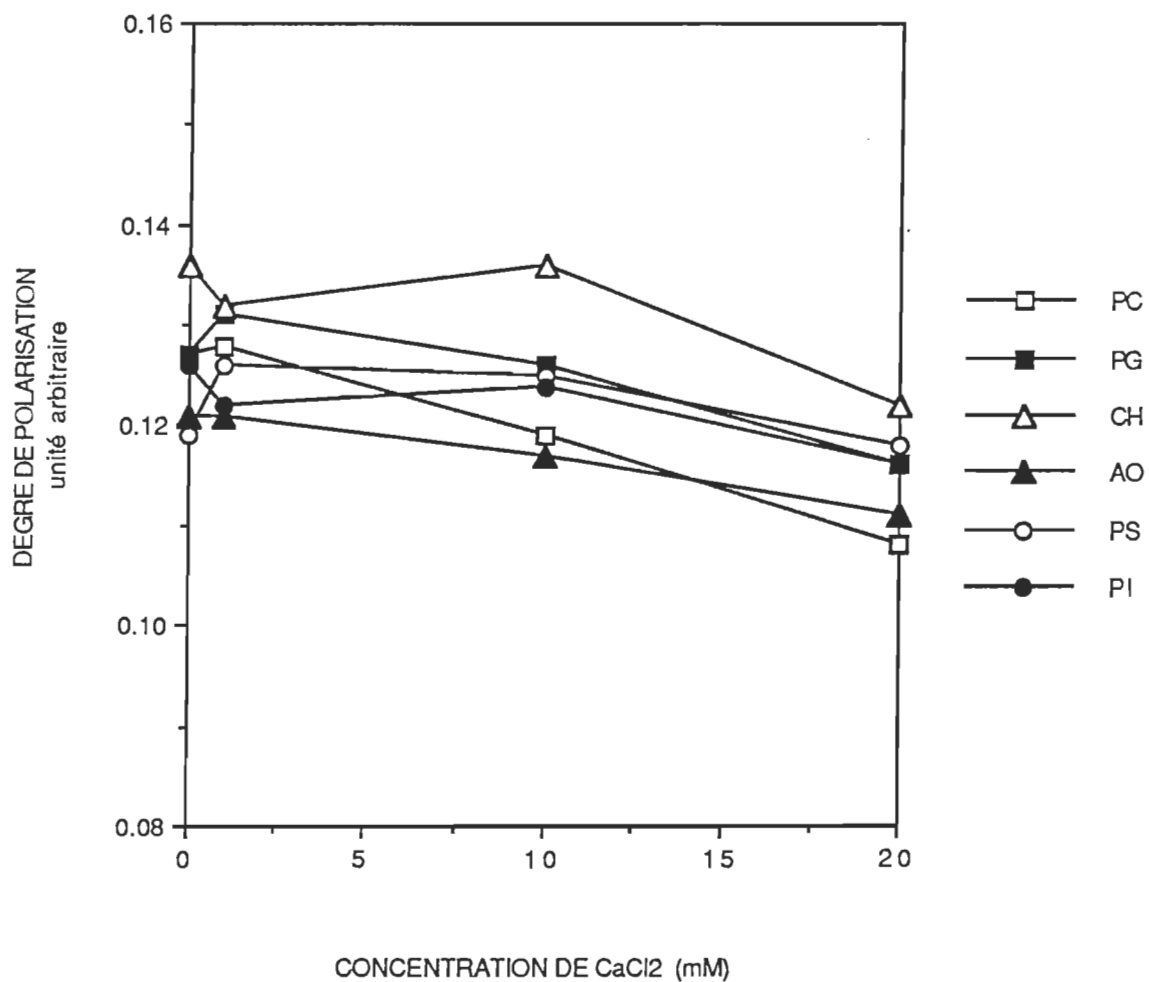
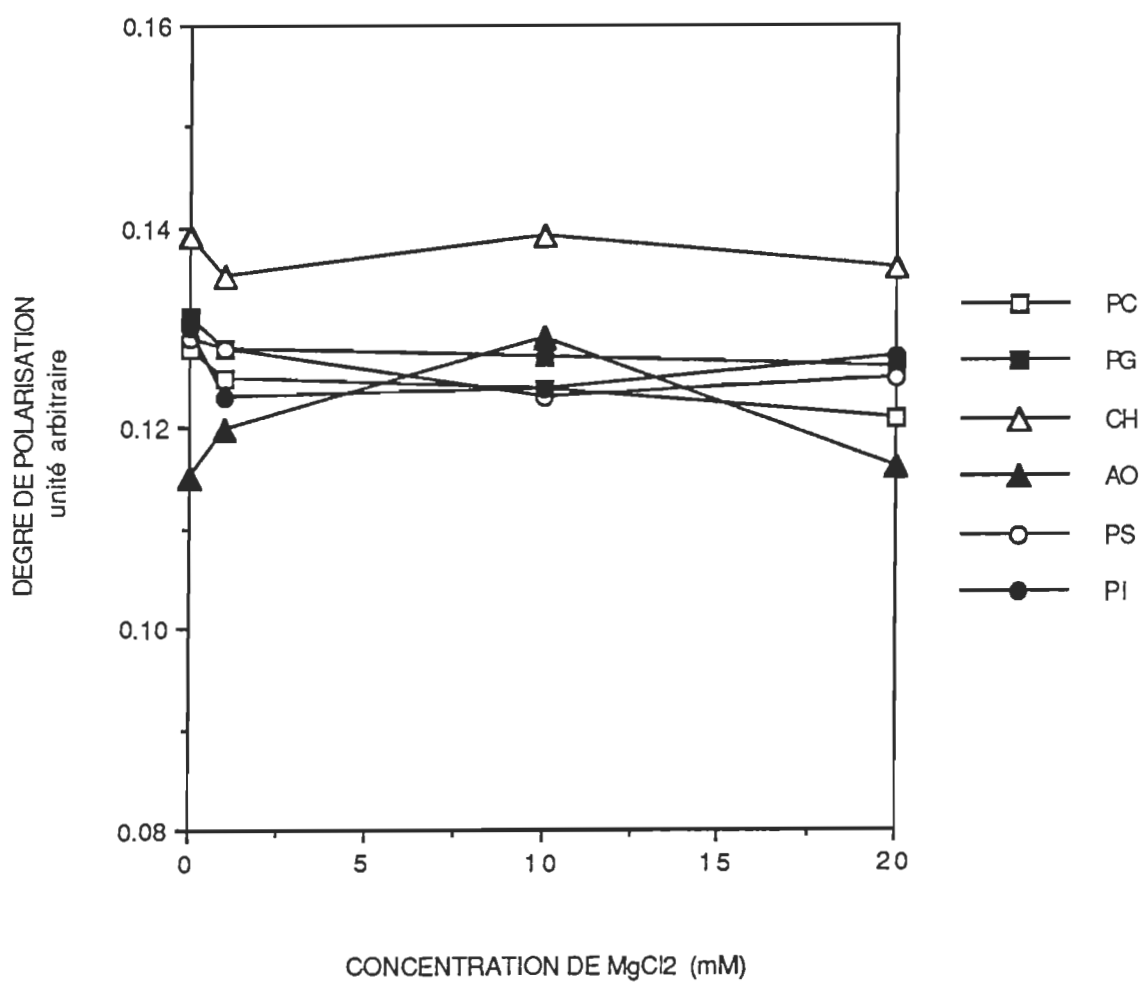


Figure 43. Degré de polarisation de la sonde DPH incorporée dans la bicouche de liposomes en fonction de la concentration d'ions  $Mg^{2+}$ , en présence d'actine-F. Concentration finale d'actine-F de 0.3 mg/ml. Concentration finale des lipides, 0.15 mM en solution dans le tampon D.

Influence des ions  $Mg^{2+}$  sur la fluidité des bicouches lipidiques  
mesurée par polarisation de fluorescence  
en présence d'actine-F



Ces résultats nous permettent de conclure qu'en absence de cations divalents, l'actine ne modifie pas la fluidité de la bicouche des liposomes. Par contre, en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'actine perturbe la bicouche des liposomes et augmente la fluidité des lipides. On ne peut tirer une telle conclusion lorsqu'il y a présence d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  dans le milieu.

#### IV- Etude de l'interaction actine-liposomes par observation des spectres de fluorescence intrinsèque de l'actine

L'actine possède les acides aminés tyrosine et tryptophane qui, lorsqu'ils sont excités par la lumière, émettent de la fluorescence. Ceci confère à l'actine une fluorescence qui lui est propre: la fluorescence intrinsèque.

Le but de cette expérience est de déterminer s'il y a modification dans l'environnement de ces acides aminés, lors de l'interaction entre l'actine et les liposomes. On détermine donc s'il y a modification du spectre d'émission de fluorescence intrinsèque de l'actine lorsque l'actine est mise au contact de liposomes de différentes compositions.

##### 1) fluorescence intrinsèque de l'actine-G en présence de liposomes

Le tableau 3 montre les valeurs de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-G au contact de liposomes, en absence et en présence de 20 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ .

On remarque que l'addition de 20 mM de cations divalents à un mélange d'actine-G et de liposomes provoque un déplacement de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine de 2 à 3 nm.

Il faut maintenant se demander si ce déplacement de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque provoqué par des cations divalents est du à un effet des cations divalents sur l'interaction actine-



liposomes ou tout simplement à une action directe des cations divalents sur l'actine.

Le tableau 4 montre les valeurs de la longueur d'onde des maximums fluorescence intrinsèque de l'actine-G seule en présence et en absence de cations divalents. On observe, en présence de 20 mM de cations divalents, un déplacement de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-G de 2 à 3 nm. L'effet observé résulte donc d'un changement conformationnel de l'actine-G sous l'action des cations divalents et non à l'interaction actine-liposomes.

## 2) fluorescence intrinsèque de l'actine-F en présence de liposomes

Les valeurs de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de mélanges actine-F-liposomes en absence et en présence de 20 mM de cations divalents sont présentées au tableau 5. Ces valeurs ne varient peu ou pas lorsqu'on ajoute des liposomes à l'actine-F que ce soit en présence ou en absence de cations divalents. Cela signifie que l'actine-F ne subit pas de changement conformationnel lors de son interaction avec les liposomes.

Le tableau 6 montre les valeurs de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-F seule en présence et en absence de cations divalents. Ces valeurs ne varient pas en présence de 20 mM de cations divalents. L'actine-F ne subit donc pas de changement conformationnel sous l'influence de cations divalents.

En conclusion, l'ajout de liposomes de différentes compositions à de l'actine-G ou à de l'actine-F n'induit pas de changement conformationnel de l'actine même dans des conditions où on observe une interaction actine-liposomes par d'autres méthodes.

Valeurs de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-G en présence de liposomes de différentes compositions				
Composition des liposomes	Ca <sup>2+</sup>		Mg <sup>2+</sup>	
	0 mM	20 mM	0 mM	20 mM
PC	330	327	330	327
PG	330	327	330	327
CH	329	327	330	327
AO	328	328	330	327
PS	329	327	330	327
PI	330	328	330	328

Tableau 3: Pics maximum d'émission de fluorescence intrinsèque de l'actine-G en présence de liposomes de différentes compositions en absence ou en présence de 20 mM d'ions Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Concentration d'actine de 0.3 mg/ml. Concentration de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G. Longueur d'onde d'excitation à 297 nm. L'ouverture des fentes d'excitation et d'émission est de 2 nm.

Valeurs de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-G seule				
Essais	Ca <sup>2+</sup>		Mg <sup>2+</sup>	
	0 mM	20 mM	0 mM	20 mM
1	331	328	330	328
2	331	328	331	328
3	329	328	330	329
4	328	328	331	328
5	329	327	330	328
6	331	328	331	328

Tableau 4: Pics maximum d'émission de fluorescence intrinsèque de l'actine-G seule, en absence ou en présence de 20 mM d'ions Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Concentration d'actine de 0.3 mg/ml. Concentration de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon G. Longueur d'onde d'excitation à 297 nm. L'ouverture des fentes d'excitation et d'émission est de 2 nm.

Valeurs de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-F en présence de liposomes de différentes compositions				
Composition des liposomes	Ca <sup>2+</sup>		Mg <sup>2+</sup>	
	0 mM	20 mM	0 mM	20 mM
PC	328	327	328	328
PG	328	327	328	327
CH	328	327	328	328
AO	328	328	328	328
PS	328	327	328	328
PI	328	327	328	329

Tableau 5: Pic maximum d'émission de fluorescence intrinsèque de l'actine-F en présence de liposomes de différentes compositions en absence ou en présence de 20 mM d'ions Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Concentration d'actine de 0.3 mg/ml. Concentration de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D. Longueur d'onde d'excitation à 297 nm. L'ouverture des fentes d'excitation et d'émission est de 2 nm.

Valeurs de la longueur d'onde des maximums de fluorescence intrinsèque de l'actine-F seule				
Essais	Ca <sup>2+</sup>		Mg <sup>2+</sup>	
	0 mM	20 mM	0 mM	20 mM
1	328	327	329	329
2	329	328	329	329
3	328	328	329	328
4	328	328	329	329
5	328	328	328	329
6	329	328	329	330

Tableau 6: Pic maximum d'émission de fluorescence intrinsèque de l'actine-F seule, en absence ou en présence de 20 mM d'ions Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Concentration d'actine de 0.3 mg/ml. Concentration de lipides de 0.21 mM en solution dans le tampon D. Longueur d'onde d'excitation à 297 nm. L'ouverture des fentes d'excitation et d'émission est de 2 nm.

V- Mise en évidence de l'interaction actine-liposomes par microscopie électronique à transmission

Les techniques de turbidimétrie, de cosédimentation et de mesure de perméabilité des liposomes à la carboxyfluorescéine ont permis de montrer l'existence d'une interaction entre l'actine et les lipides. L'utilisation de la microscopie électronique apporte des renseignements supplémentaires sur cette interaction entre l'actine et les liposomes puisqu'elle permet de visualiser les complexes obtenus.

Par turbidimétrie et cosédimentation, il a été montré, qu'en présence de 20 mM de cations divalents, qui peuvent être soit le  $\text{Ca}^{2+}$ , soit le  $\text{Mg}^{2+}$ , il se produit une agrégation de l'actine et des liposomes. Ces agrégats sont observables en microscopie électronique.

La figure 44 montre une préparation d'un mélange d'actine-F et de liposomes de petite dimension (SUV), en présence de 20 mM d'ions  $\text{Mg}^{2+}$ . Les liposomes ont tendance à se regrouper tout le long du paracristal d'actine. Cette organisation des liposomes en "chainettes" peut apparaître quelquefois de façon plus régulière. A la figure 45, on voit que les liposomes sont disposés les uns à côté des autres à l'intérieur du paracristal. Ces liposomes prennent même une forme carré sous l'effet de la contrainte imposée par les filaments d'actine.

Ces deux photographies au microscope électronique confirment les résultats de turbidimétrie et de cosédimentation puisqu'on peut voir des

agrégats d'actine et de liposomes et c'est la formation de ces agrégats qui cause l'augmentation de turbidité.

Ces formations d'agrégats d'actine et de liposomes en "chainette" se produisent quelle que soit la composition du liposome en lipides, que ce soit avec l'actine-G ou avec l'actine-F, ou que l'on soit en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ .

La figure 46 montre un grand nombre de petits liposomes SUV en interaction avec l'actine en présence de 20 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces liposomes sont disposés en amas le long du paracristal d'actine. L'actine au départ était sous forme monomérique mais a formé des paracristaux sous l'influence des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Il y a quelques liposomes qui ne sont pas en contact avec des filaments d'actine mais la majorité sont liés aux filaments. Cet agrégat d'actine et de liposomes est assez volumineux et peut donc sédimenter à 7000 g X 10 minutes, ce qui permet d'interpréter les résultats obtenus par cosédimentation.

Dans certains cas, les interactions actine-liposomes ne sont pas aussi évidentes que celles que nous venons de décrire. A la figure 47, on observe de l'actine et des liposomes qui se côtoient dans le milieu. Quelques liposomes sont associés à l'actine, par contre, d'autres sont dispersés dans le milieu. On peut se demander s'il se produit réellement une interaction dans ce cas.



Quelques observations en microscopie électronique ont été faites avec des liposomes unilamellaires de grande taille (LUV) et de l'actine, en présence et en absence de 20 mM d'ions divalents. Ces liposomes LUV possèdent l'avantage, par rapport aux SUV, d'avoir une grande surface qui peut facilement se déformer ce qui est de nature à favoriser les interactions avec de longs filaments d'actine.

A la figure 48, on peut voir qu'en absence de cations divalents, il ne se produit aucune interaction entre l'actine et les liposomes. On peut observer de l'actine et des liposomes, mais aucune évidence d'interaction entre les deux.

Cette figure confirme les résultats obtenus en turbidimétrie puisqu'en absence de cations divalents, il ne se produit pas de hausse de turbidité. Par contre, les résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par mesure de perméabilité des liposomes à la CF. En effet, en absence de cations divalents il se produit une interaction entre l'actine et les liposomes car il y a une augmentation de la perméabilité des liposomes à la CF. Cette interaction qui est probablement de nature hydrophobe n'est donc pas observable par la technique de microscopie électronique. Cette interaction est probablement faible et ne résiste pas à la manipulation lors de la préparation des spécimens pour la microscopie électronique. Il se peut aussi que ce type d'interaction ne cause pas la formation de structures régulières qui puissent être observables par microscopie électronique.

Aux figures 49 et 50, on voit un agrégat formé de deux liposomes réunis ensemble par des filaments d'actine. L'existence d'une interaction directe entre l'actine et les liposomes est ici beaucoup plus évidente que dans le cas des SUV. En effet, on peut remarquer que l'actine n'est pas disposée au hasard à la surface des liposomes mais forme des structures régulières que l'on peut bien observer à plus fort grossissement sur les figures suivantes. Ainsi, à la figure 51, où deux liposomes sont en interaction avec l'actine, les filaments d'actine sont disposés à la surface des liposomes et forment des structures cristallines. Les filaments d'actine forment une monocouche à la surface du liposome, composée de filaments d'actine parallèles disposés en phase. La monocouche d'actine présente donc une périodicité transversale de 37.5 nm qui correspond à la périodicité du filament d'actine.

La figure 52 montre aussi un liposome sur lequel sont disposés les filaments d'actine en paracristal dont la périodicité est égale au pas du filament d'actine.

Dans certains cas, la disposition de l'actine sur le liposome se fait différemment. Ainsi, à la figure 53, on peut voir que les filaments d'actine s'entrecroisent de manière régulière, pour se disposer en "filet", à la surface du liposome.

On retrouve aussi parfois les deux types d'organisation: filaments parallèles et en "filet" sur le même liposome. A la figure 54, on voit un liposome, à fort grossissement. A une de ses extrémités, les filaments sont orientés

parallèlement les uns aux autres et à l'autre extrémité les mêmes filaments s'entrecroisent pour former un "filet". On peut aussi voir à la figure 55, que les mêmes filaments d'actine reliant deux liposomes sont disposés différemment à la surface des deux liposomes.

L'interaction est beaucoup plus évidente avec les LUV qu'avec les SUV, tout d'abord pour une simple raison technique. En effet, si un petit liposome (SUV) se trouve en contact de l'actine, on ne peut dire s'il existe une interaction réelle entre l'actine et les lipides ou si l'actine et les liposomes se sont disposés ainsi par hasard sur la grille. Par contre avec un liposome de grande taille (LUV), la surface de contact est beaucoup plus grande et l'actine forme des structures régulières qui ne peuvent être le fait du hasard.

De plus, il est fort probable, que l'interaction actine-liposome soit différente selon la taille du liposome. En effet, les filaments d'actine et surtout les paracristaux sont des structures assez rigides. En conséquence, un filament ou un paracristal d'actine ne peut interagir beaucoup avec un petit liposome en raison de sa flexibilité limitée et du rayon de courbure du liposome. Par contre, comme la surface d'un grand liposome est relativement flexible, elle peut s'adapter aux filaments d'actine. Les points d'interaction entre les filaments d'actine et les liposomes sont alors plus nombreux dans ce cas.

L'ensemble des observations en microscopie électronique nous permet de tirer les conclusions suivantes:

- il se produit une interaction entre l'actine et les lipides membranaires
- cette interaction ne se fait qu'en présence d'une concentration millimolaire de cations divalents qui peuvent être soit le  $\text{Ca}^{2+}$ , soit le  $\text{Mg}^{2+}$
- lors de l'interaction, l'actine se dispose de façon régulière à la surface des liposomes. On observe des structures en filaments parallèles et des structures en "filet"
- l'interaction ne dépend pas de la tête polaire des lipides
- les interactions sont plus évidentes avec les LUV qu'avec les SUV probablement pour de simples raisons physiques.

Figure 44. Agrégat d'actine et de petits liposomes (SUV) composés à 100% de PC en présence de 20 mM  $Mg^{2+}$ . Les liposomes sont disposés en "chainettes" le long du paracristal d'actine.

Concentration finale d'actine : 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides : 0.5 mM

Grossissement: 104 000 X



Figure 45: Interaction entre l'actine et des liposomes (SUV) formés de 100% PC, en présence de 20 mM d'ions  $Mg^{2+}$ . Les liposomes disposés en "chainettes" prennent une forme carrée sous la contrainte imposée par le paracristal d'actine.

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 189 000 X





Figure 46. Agrégat d'actine et de liposomes (SUV) formés de 90% PC et 10% PI, en présence de 20 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Les petits liposomes sont disposés tout le long du para-cristal d'actine ce qui suggère une interaction entre les deux constituants.

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 56 000 X

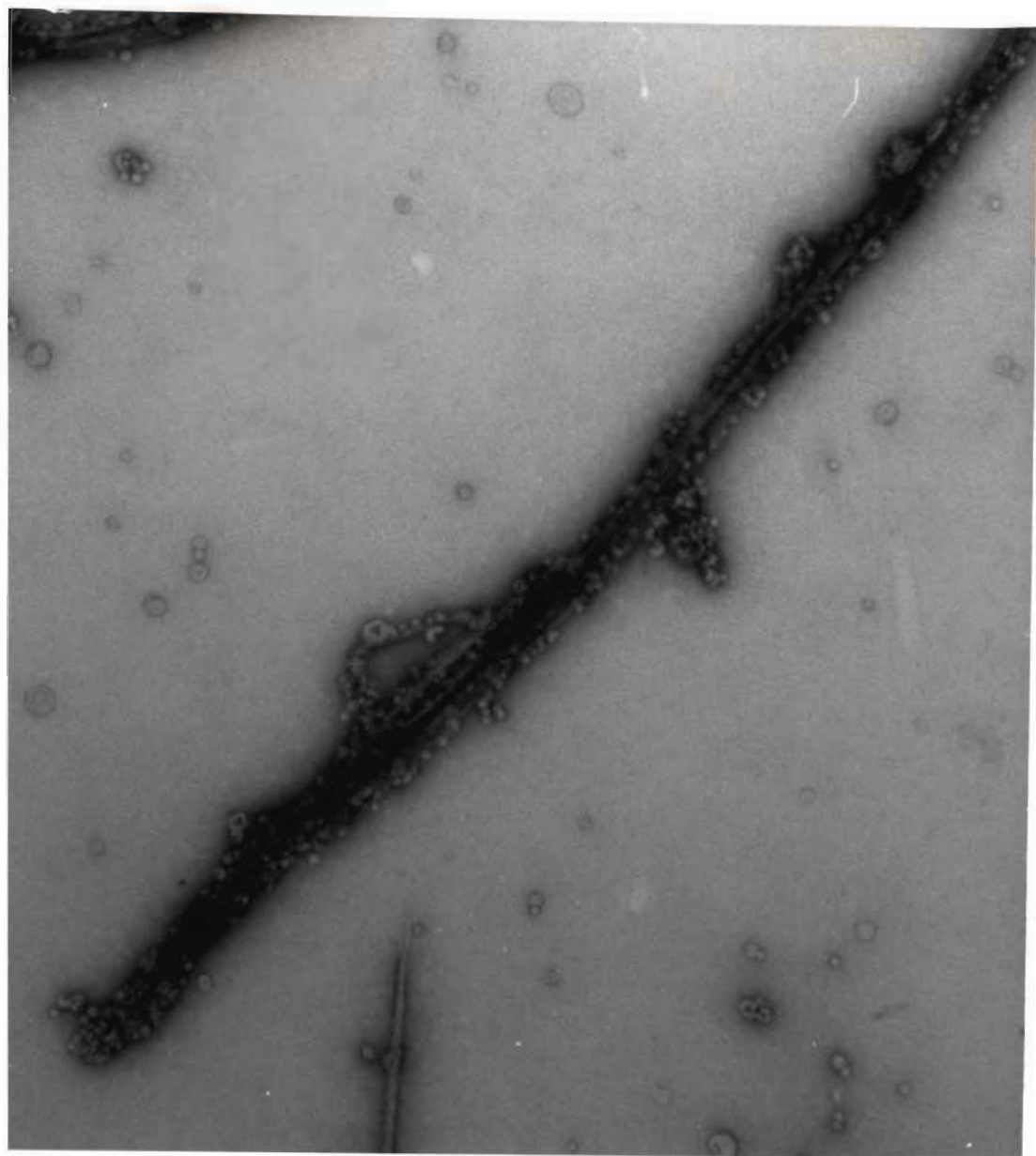


Figure 47. Mélange d'actine-F et de liposomes (SUV) composés de 90% PC et 10% CH, en présence d'ions  $Mg^{2+}$ . Les liposomes sont, en majorité, disposés à proximité de l'actine. Ce qui suggère une interaction entre l'actine et les liposomes.

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 83 000 X

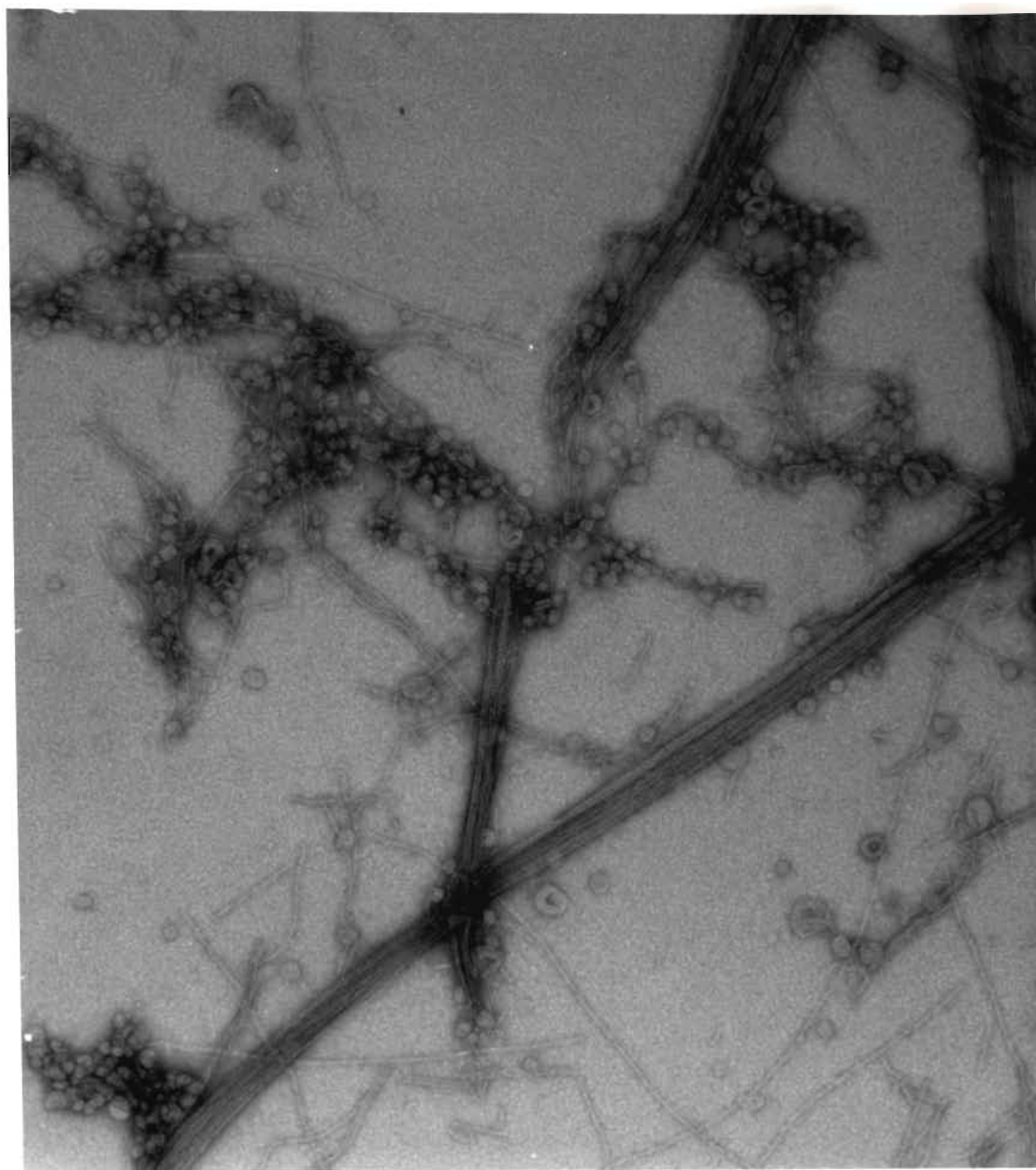


Figure 48: Mélange d'actine et de gros liposomes (LUV) formés de 90% PC et 10% AO, en absence de cations divalents. Les filaments d'actine et les liposomes se côtoient dans le milieu mais aucune interaction n'est observée.

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 62 000 X

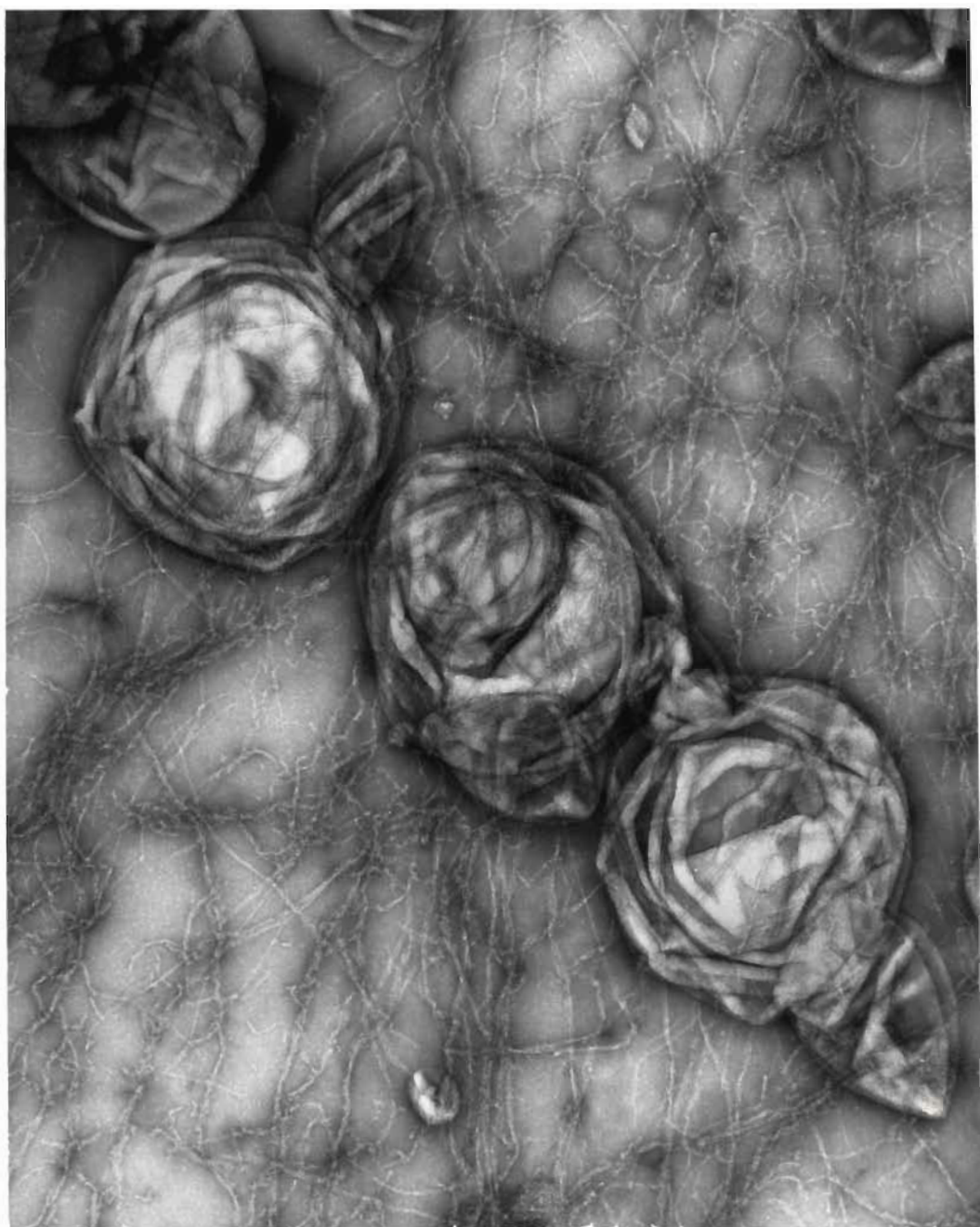


Figure 49: Agrégat d'actine et de liposomes (LUV) composés de 90% PC et 10% CH, en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . L'actine à la surface des liposomes est disposée de façon régulière. Par contre en dehors de la surface des liposomes l'arrangement régulier disparaît.

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 60 000 X



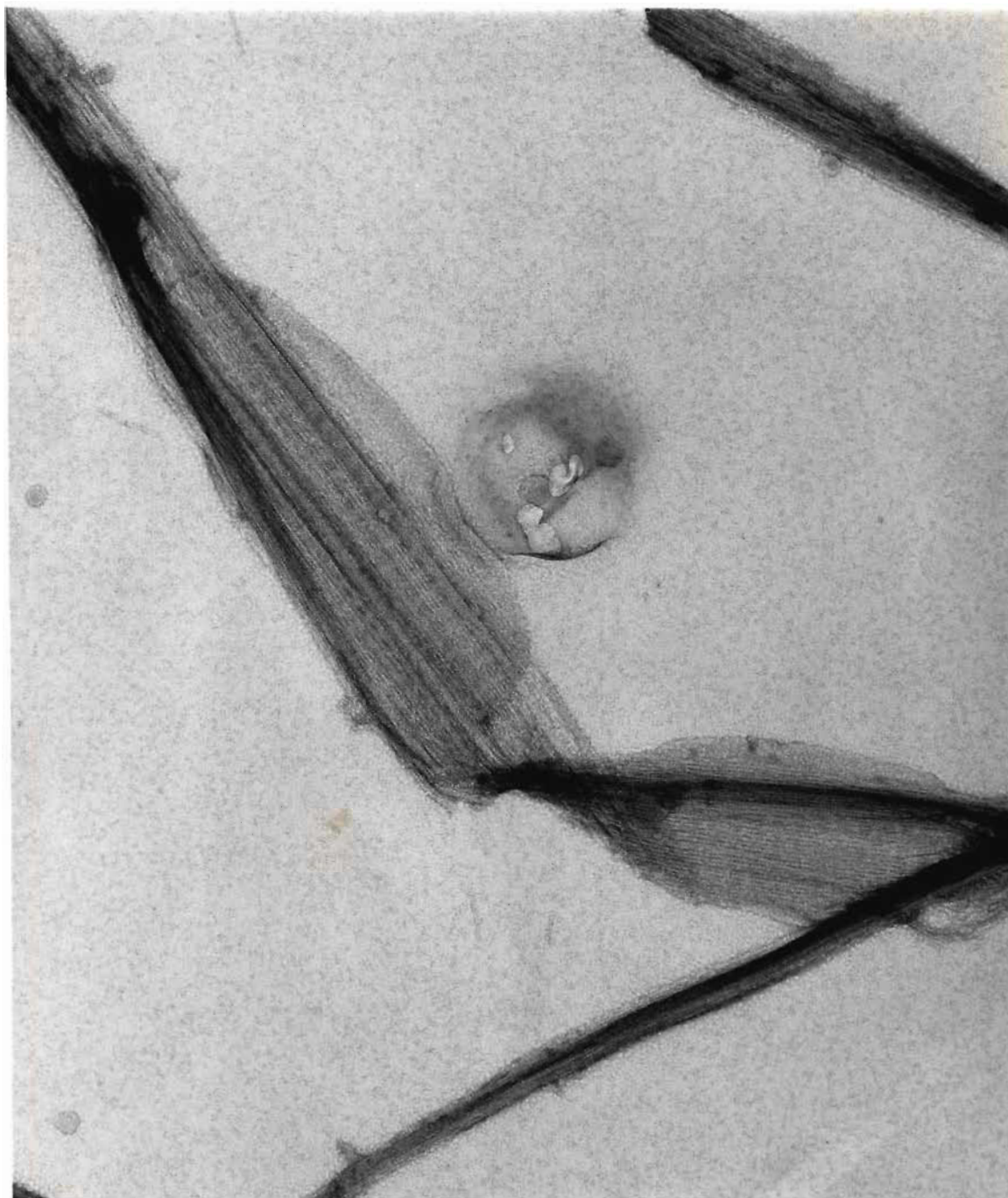




Figure 50: Deux liposomes reliés par des filaments d'actine. A la surface des liposomes, les filaments d'actine sont juxtaposés les uns parallèles aux autres et en phase. Les gros liposomes sont composés de 90% PC et 10% CH. Réaction faite en présence de 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .  
Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml  
Concentration finale de lipides: 0.5 mM  
Grossissement: 96 500 X

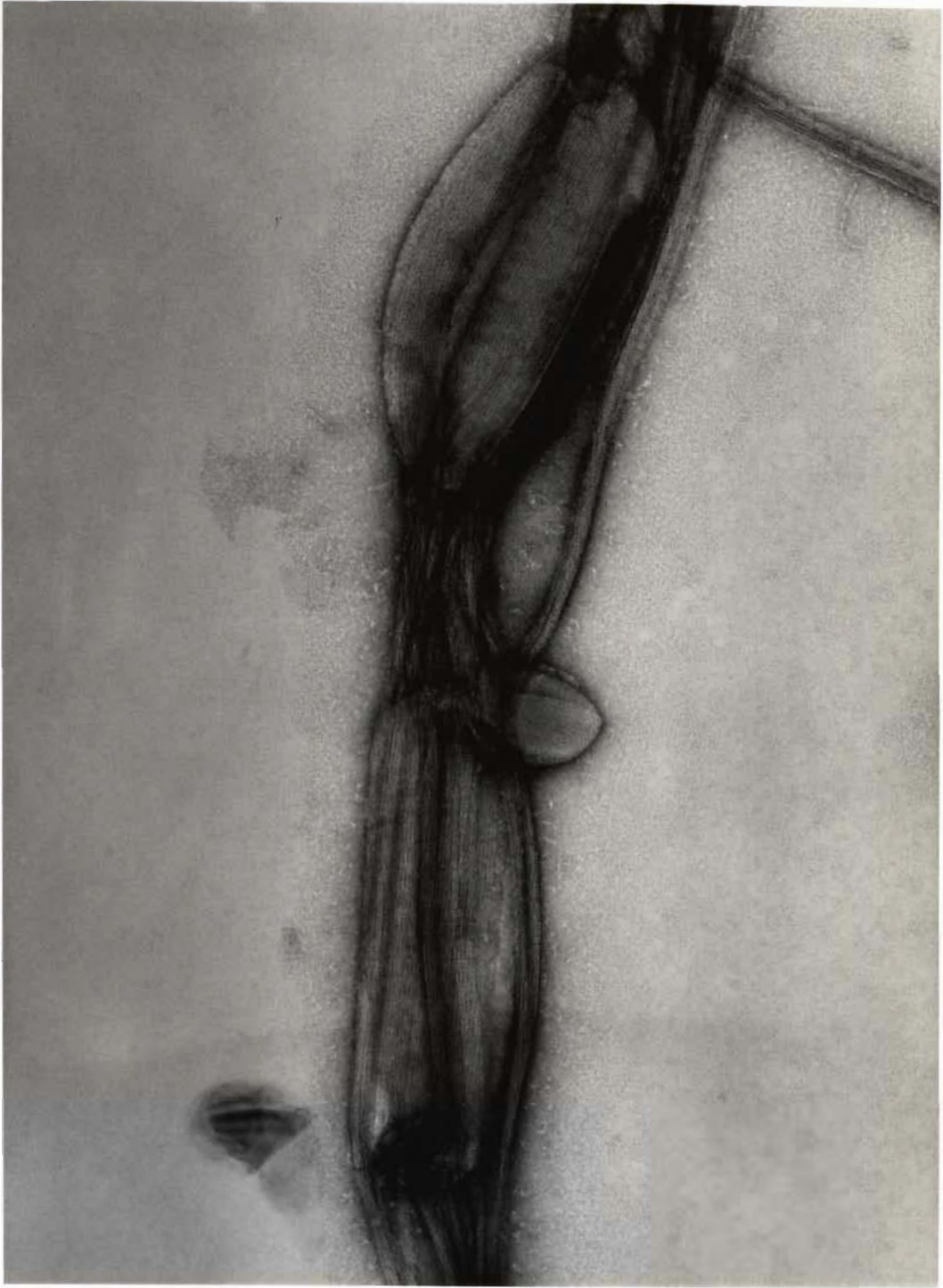


Figure 51: Agrégat de liposomes et d'actine formé en présence de 20 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . A la surface des gros liposomes composés de 90% PC et 10% PS, l'actine forme des paracristaux avec des filaments juxtaposés en phase. Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml  
Concentration finale de lipides: 0.5 mM  
Grossissement: 94 000 X



Figure 52: Un liposome (LUV) isolé interagit avec plusieurs paracristaux d'actine en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Les filaments d'actine sont ici aussi juxtaposés en phase. Les liposomes sont composés de 90% PC et 10% PS. Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml  
Concentration finale de lipides: 0.5 mM  
Grossissement: 91 000 X



Figure 53: Des filaments d'actine disposés en "filet" à la surface d'un gros liposome (LUV) composé de 100% PC en présence de 20 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . A l'extérieur du liposome, les filaments ne possèdent pas de périodicité aussi régulière que sur le liposome.

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 65 400 X



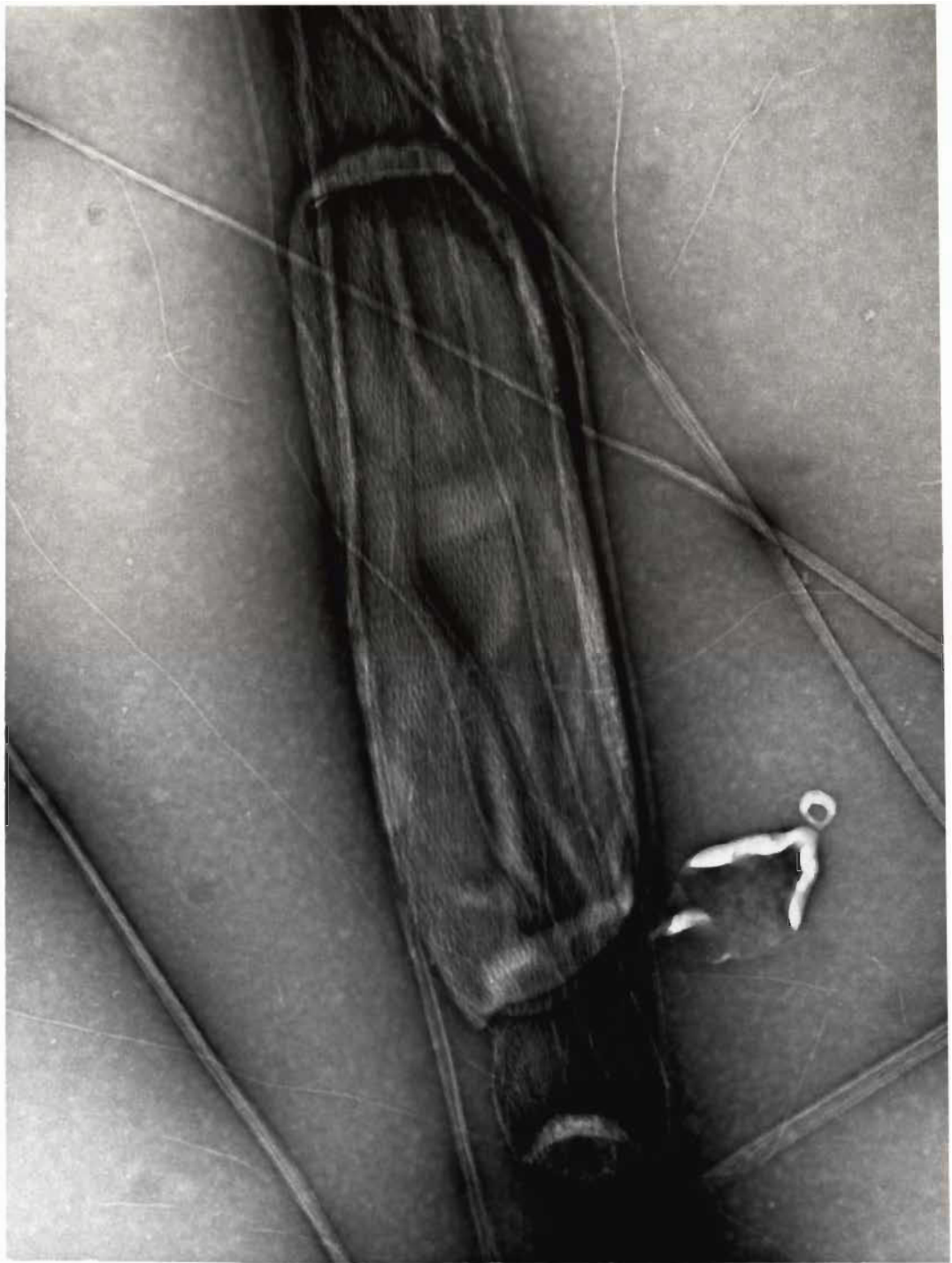




Figure 54: A la surface de ce liposome, on retrouve les deux types d'organisation des filaments d'actine. A l'extrémité supérieure, les filaments sont disposés en phase, parallèlement les uns aux autres. A l'extrémité inférieure, la disposition en "filet" peut être observée. L'actine et les liposomes (LUV) composés de 90% PC et 10% CH ont été mélangés en présence de 20 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 94 000 X

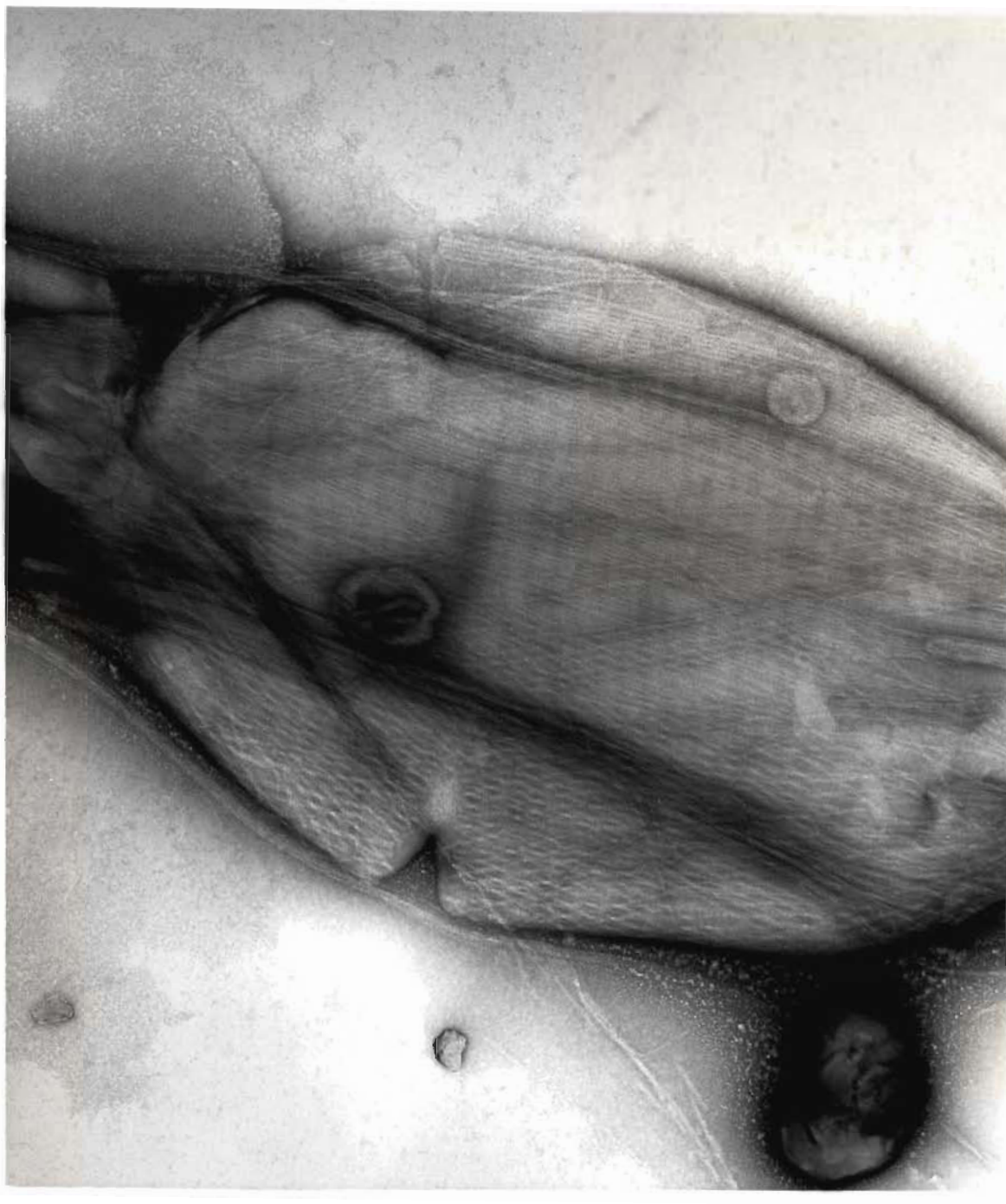


Figure 55: Filaments d'actine reliant deux liposomes. Sur un liposome, les filaments sont disposés parallèlement et en phase. Sur l'autre liposome, ces mêmes filaments prennent la structure en "filet". Les liposomes sont composés de 90% PC et 10% PS et mis en présence d'actine et d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

Concentration finale d'actine: 0.3 mg/ml

Concentration finale de lipides: 0.5 mM

Grossissement: 90 000 X



## Conclusions

Nos résultats nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

- Il existe une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires
- Cette interaction se produit aussi bien avec l'actine-G qu'avec l'actine-F
- La nature des lipides qui composent les liposomes n'a pas d'influence sur l'interaction actine-liposomes
- Par turbidimétrie et cosédimentation, on observe une interaction actine-lipides seulement en présence d'une concentration de cations divalents de l'ordre de 10 mM
- Par mesure de perméabilité des liposomes à la carboxyfluorescéine, on observe aussi une interaction entre l'actine et les lipides en absence de cations divalents
- En présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'actine provoque des changements dans l'arrangement des chaînes acyls des lipides de la bicouche des liposomes comme montré par la technique de polarisation de fluorescence
- L'interaction actine-lipides n'entraîne pas de modification de l'état conformationnel de l'actine.

## DISCUSSION

La surface interne de la membrane plasmique des cellules est toujours en contact avec les protéines cytoplasmiques. Il a depuis longtemps été proposé qu'il existe certaines interactions entre les protéines et la membrane (11). Cette hypothèse a été confirmée lors des études de l'interaction entre les membranes et certaines protéines comme la protéine kinase C (178), la calpaine (126), la calmoduline (166), la protéine 33 kD extraite des leucocytes (162), etc...

Ces interactions protéines-membranes peuvent se faire selon deux mécanismes:

- 1) interaction directe entre les protéines cytoplasmiques et les lipides composant la membrane plasmique
- 2) interaction entre les protéines cytoplasmiques et certaines protéines intermédiaires, périphériques ou intégrales de la membrane

Ce dernier mécanisme a clairement été mis en évidence dans le cas des globules rouges et des cellules tumorales (12). Par contre, l'existence d'une interaction directe protéine cytoplasmique-lipides membranaires a fait

l'objet de peu d'études (112, 113, 142, 163). Chapman et coll (26) ont cependant suggéré que les phospholipides membranaires jouent un rôle important dans l'interaction entre les protéines cytoplasmiques et les membranes plasmiques surtout s'il y a présence de phospholipides acides.

L'actine est une protéine cytoplasmique qui joue un rôle essentiel au niveau du maintien de la structure cellulaire et des phénomènes de motilité. Pour accomplir ces nombreuses fonctions, il appert que l'actine doit être liée aux membranes cytoplasmiques. Comme il a déjà été souligné dans l'introduction, il est généralement admis que l'interaction entre l'actine et les membranes naturelles se fait par l'intermédiaire d'une ou de plusieurs autres protéines. Plusieurs de ces protéines liant l'actine aux membranes ont été identifiées. L'hypothèse d'une liaison directe entre l'actine et les lipides a quelquefois été envisagée (87, 112, 113, 131, 163) mais n'a jamais fait l'objet d'une étude approfondie et les résultats n'ont jamais été convaincants. Au cours de la maîtrise (145), nous avons établi qu'il existe une interaction directe actine-lipides *in vitro* à condition que les lipides utilisés soient chargés positivement. Or, les membranes naturelles ne contiennent pas de lipides chargés positivement. Nous avons cependant poursuivi ces études au niveau du doctorat en utilisant cette fois des lipides présents dans les membranes naturelles. Ces conditions se rapprochent donc beaucoup plus de ce qui peut se produire *in vivo*. Nous avons au cours de ce travail, montré qu'il existe effectivement une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires. C'est la première fois qu'une telle interaction est montrée dans des conditions qui pourraient exister *in vivo*.

Ceci n'exclut cependant pas la possibilité que certaines protéines membranaires jouent un rôle d'intermédiaire dans la liaison de l'actine aux membranes. Il existerait en somme 2 mécanismes d'interaction entre l'actine et les membranes dans la cellule: une interaction directe avec les lipides membranaires et une interaction par l'intermédiaire de protéines membranaires liant l'actine.

### Critiques des techniques utilisées

Pour les études de l'interaction entre l'actine et les lipides naturels, 6 techniques ont été utilisées: la turbidimétrie, la cosédimentation, la mesure de perméabilité des liposomes à la carboxyfluorescéine, le degré de polarisation d'une sonde fluorescente (DPH), l'analyse du spectre de la fluorescence intrinsèque de l'actine et finalement la microscopie électronique. Chacune de ces techniques sera critiquée ainsi que les résultats obtenus par ces méthodes.

Il faut tout d'abord souligner qu'à partir du moment où l'on ajoute des ions divalents à de l'actine-G, elle polymérise et se transforme en actine-F. Le phénomène est montré à la figure 13. Au fur et à mesure qu'on ajoute des cations divalents, les solutions deviennent turbides dûe à la polymérisation de l'actine. Ainsi, lors des études de l'interaction actine-G-liposomes en présence de cations divalents, nous avons finalement de l'actine-F dans le mélange. Ceci nous a permis de voir que la polymérisation de l'actine en



présence des liposomes accentue l'interaction par rapport à ce que nous obtenons lorsqu'on ajoute de l'actine déjà polymérisée à des liposomes. Par exemple en turbidimétrie, on montre que les agrégats sont plus gros quand l'actine est polymérisée en présence des liposomes. Il en est de même pour l'étude de la perméabilité des liposomes à la CF.

#### A) Turbidimétrie et cosédimentation

Ces techniques ont déjà été utilisées par plusieurs auteurs pour montrer une liaison entre une ou plusieurs protéines et des membranes naturelles (72, 115, 116), et dans d'autres cas, pour montrer l'agrégation de liposomes entre eux (179). Ces méthodes nous renseignent sur l'interaction entre les protéines et les liposomes à condition cependant que celle-ci se traduise par la formation d'agrégats.

Il y a lieu de souligner qu'une interaction entre les protéines et les lipides ne résulte pas nécessairement par la formation d'agrégats. Ceci a été mis en évidence sur les travaux d'Ostlund et coll. (115), Oplatka et coll. (116) et Howell et coll. (72). Ces auteurs ont étudié l'interaction entre différents types de vésicules formées de membranes naturelles et l'actine-F. Ils n'ont pas observé d'agrégation des vésicules avec de l'actine-F, alors qu'ils ont mis en évidence par d'autres techniques, l'existence d'une interaction entre ces vésicules naturelles et l'actine-F. Leurs expériences montrent bien qu'une interaction entre l'actine et les membranes ne résulte pas nécessairement par la formation d'agrégats. Pour que l'agrégation se produise, il faut qu'il

existe des liens multiples entre les constituants. En conséquence, un résultat positif par cette technique permet de conclure à l'existence d'une interaction, mais un résultat négatif ne permet pas de conclure qu'il n'existe pas d'interaction.

Ceci est particulièrement vrai dans notre cas. En effet, nos résultats de turbidimétrie montrent qu'il se forme des agrégats actine-liposomes seulement en présence de cations divalents mais pas en leur absence. Or, les résultats des mesures de perméabilité des liposomes à la CF montrent qu'il existe bel et bien une interaction entre l'actine et les liposomes en absence de cations divalents.

#### B) Mesures de la perméabilité des liposomes à la carboxyfluorescéine

Un inconvénient de cette méthode est que certains facteurs modifient la fluorescence de la CF. Ainsi, le  $K^+$ , le Tris et surtout les détergents tels que l'Ammonyx L-O et le Triton X-100 agissent sur la CF en augmentant ou en diminuant sa fluorescence. Dans notre cas, ceci n'a pas de conséquence puisque nos solutions contiennent des quantités fixes de  $K^+$  et de Tris. On ne peut par contre exprimer nos résultats en "pourcentage" de sortie de CF des liposomes car pour avoir la quantité totale de CF encapsulée dans les liposomes, il faut les traiter aux détergents qui modifient la fluorescence de la CF. Le fait de ne pas pouvoir exprimer nos résultats en "pourcentage" de sortie de CF des liposomes n'a cependant pas d'inconvénient majeur puisque nos résultats

sont surtout comparatifs.

Cette technique possède l'avantage de nous informer sur le mécanisme d'interaction entre la protéine et les lipides. En effet, si l'interaction entre les protéines et les liposomes entraîne une hausse de perméabilité, cela signifie que les lipides composant la bicouche sont perturbés. Kimelberg et Papahadjopoulos en 1971 (81) ont suggéré qu'une hausse de la perméabilité des bicouches lipidiques est provoquée par une déformation de l'arrangement des chaînes d'acides gras, qui résulterait d'une interaction hydrophobe.

Nos résultats montrent que la perméabilité des liposomes à la CF, en absence de cations divalents, est augmentée lorsqu'il y a de l'actine, ce qui suggère fortement l'existence d'une interaction de type hydrophobe.

L'interaction est plus marquée avec l'actine-G qu'avec l'actine-F. Du à leur forme filamenteuse, les filaments d'actine ont plus de difficultés à s'intégrer dans la bicouche et ainsi à créer des interactions hydrophobes avec les lipides. De plus, les monomères d'actine inclus dans le centre du filament ou du paracristal ne peuvent entrer en contact avec les lipides.

### C) Degré de polarisation de la sonde DPH

L'incorporation de la sonde DPH dans la partie hydrophobe d'une bicouche lipidique fut mise au point par Shinitski et coll. (136, 137). Ces auteurs ont

montré que les valeurs de polarisation peuvent être corrélées à la fluidité des membranes.

Dans notre étude, la mobilité de la sonde DPH, estimée par les mesures du degré de polarisation de la sonde (49), est affectée par la présence d'actine dans certains cas seulement. En absence de cations divalents, on ne note aucune modification de la mobilité de la sonde. Par contre, en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , le degré de polarisation de la sonde diminue, le phénomène est moins évident en présence d'ions  $\text{Mg}^{2+}$ . Les conclusions sont en accord avec celles obtenues par mesure de la perméabilité de la membrane des liposomes à la CF. En effet, en présence de cations divalents, l'actine provoque une hausse de la perméabilité des liposomes qui doit résulter d'une altération de l'organisation des lipides. Ainsi, cette altération entraîne une modification de la mobilité de la sonde dans les lipides de la membrane. Il est probable que la désorganisation des lipides qui résulte de l'interaction avec l'actine soit faible puisque la diminution du degré de polarisation de la sonde n'est pas très marquée.

Il serait intéressant de refaire ces expériences avec une autre sonde hydrophobe comme le pérylène qui possède une structure ovoïde plutôt qu'avec le DPH qui a une structure en bâtonnet. Si l'insertion de l'actine au niveau de la bicouche se fait peu profondément, il se peut que la modification de l'organisation des chaînes d'acides gras soit faible, ce qui n'entraînerait pas de changement dans la mobilité de la sonde DPH. Par contre, une sonde de forme plus ovoïde, peut pivoter plus facilement sur elle-même et serait par

conséquent plus sensible aux modifications de l'organisation des lipides.

#### D) Spectre de fluorescence intrinsèque de l'actine

Grace à cette technique, il est possible de mettre en évidence un changement conformationnel d'une protéine. Selon le type de protéine, ces changements conformationnels peuvent provoquer une augmentation ou une diminution de la fluorescence intrinsèque ou encore un déplacement du maximum d'émission de fluorescence. Cette technique n'est pas spécifique à l'actine mais peut s'appliquer à plusieurs protéines possédant des acides aminés aromatiques.

Nos résultats ont montré que l'environnement des acides aminés tryptophane et tyrosine n'est pas modifié lors de l'interaction de l'actine avec les lipides. Nous pensons donc que l'actine ne subit pas de changement conformationnel lors de son interaction avec les lipides. Cependant, un changement local de conformation, qui ne concernerait pas les acides aminés tryptophane et tyrosine, ne peut être écarté.

Cette technique donne des résultats positifs surtout quand les protéines sont capables de créer des liens non-polaires très forts avec les lipides.

Il faut comprendre que ces résultats ne signifient pas pour autant qu'il n'y a pas d'interaction hydrophobe, mais plutôt qu'il ne se produit pas de changement conformationnel de la protéine impliquant la modification dans l'environnement des groupements tryptophane et tyrosine.

#### E) Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission est une méthode complémentaire, elle ne permet pas de quantifier le phénomène d'interaction entre l'actine et les liposomes mais elle permet de visualiser cette interaction.

Cette technique possède aussi ses limites. Elle n'est pas utile si les interactions lipides-protéines sont faibles. Ainsi, par mesure de la perméabilité des liposomes à la CF, nous avons montré une interaction entre l'actine et les lipides membranaires en absence de cations divalents, mais cette interaction n'est pas visible en microscopie électronique à transmission. Ceci doit être dû au fait que l'intensité d'interaction entre l'actine et les lipides est faible. Ainsi, lors de la préparation des spécimens lorsqu'on enlève le surplus de colorant, sur la grille, il peut y avoir dissociation de l'actine et des lipides.

On peut aussi se demander si les paracristaux formés à la surface des liposomes ne résultent pas d'une réaction entre l'actine et le colorant: l'acétate d'uranium. Cette réaction est peu probable puisque dans certaines conditions, comme en absence de cations divalents, il n'y a pas de paracristaux formés mais l'actine est présente sous forme de filaments isolés.

### Critiques des méthodes de préparation des liposomes et du choix des lipides

Pour l'étude de l'interaction actine-lipides membranaires, nous avons utilisé un système qui ne comporte que de l'actine et des lipides sous forme de bicouches appelées liposomes. Par conséquent tout phénomène d'interaction résulte d'une liaison directe de l'actine avec les lipides puisqu'il n'y a pas d'autre constituant dans ce système.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, il existe plusieurs types de liposomes. Nous avons opté pour l'utilisation de liposomes unilamellaires de petite taille (SUV) car ce sont les liposomes les plus faciles à obtenir et les plus couramment utilisés, ce qui facilite la comparaison avec d'autres études protéine-lipides. Ils ont aussi l'avantage de ne posséder qu'une seule bicouche, caractéristique indispensable pour les études de perméabilité des liposomes.

Cependant, les SUV ont l'inconvénient de posséder une forte asymétrie des lipides de part et d'autre de la bicouche (jusqu'à 70% des lipides sur la face externe du liposomes et 30% sur la face interne). La composition de la surface externe de nos liposomes ne peut donc être connue avec précision. On sait que certains lipides chargés négativement ont tendance à se disposer du côté interne de la bicouche lorsqu'ils sont en faible concentration, ces lipides transfèrent vers la couche externe du liposome quand leur concentration augmente à cause de la force de répulsion qu'ils exercent les uns envers les autres.

D'autre part, ces liposomes sont très petits (20-50 nm) et, comme leur rayon de courbure est faible, l'interaction actine-lipides peut être limitée pour une simple raison de géométrie. En effet, l'actine qui est polymérisée en filaments ou en paracristaux a une flexibilité limitée. Tous les monomères d'un filament d'actine ne peuvent donc pas toujours être en contact avec la surface d'un liposome de faible rayon de courbure. Par contre, les gros liposomes peuvent se déformer facilement et établir des interactions sur toute la longueur d'un ou plusieurs filaments, ce qui est confirmé par nos observations en microscopie électronique.

Les gros liposomes (LUV) sont plus difficiles à obtenir. Les préparations contiennent souvent des MLV dont on ne peut se débarrasser. De plus, les LUV sont difficiles à chromatographier à cause de leur grande dimension. En conséquence, le choix des SUV nous a paru bien indiqué pour les études à caractère physicochimique alors que les LUV sont plus indiqués pour la microscopie électronique.

Les lipides utilisés sont le PC, PG, PI, PS et CH et ont été choisis parce qu'il est facile de se les procurer et, de plus, ce sont les composants des membranes naturelles. Comme on le sait, les membranes biologiques sont toutes chargées négativement. Nous avons donc opté pour le PG, PI et PS qui ont une charge globale négative ainsi que le cholestérol qui est présent en abondance dans les membranes naturelles. D'autre part, Chapman et coll. (26) ont montré que les phospholipides acides jouent un rôle important dans la liaison de protéines cytoplasmiques à la membrane plasmique.



Toutes les expériences ont été faites avec 6 compositions lipidiques différentes (PC, PG, PI, PS, CH, AO). Un des buts de notre projet était de savoir si la tête polaire joue un rôle dans l'interaction actine-lipides membranaires. Comme on peut le constater, quelle que soit la dimension, la nature ou la charge de la tête polaire, les résultats sont similaires montrant ainsi que l'interaction actine-lipides se produit quelle que soit la nature polaire des lipides et par conséquent, l'interaction actine-lipides n'implique pas de liaison entre des sites spécifiques de l'actine avec les têtes polaires des lipides.

#### Considérations sur l'importance de la température de transition des lipides lors des interactions actine-lipides

La fluidité des lipides dépend de la température. Au-dessous de la température de transition, les chaînes d'acides gras sont dans un état rigide en conformation tout-trans. En augmentant la température au-dessus de la température de transition, ces chaînes d'acides gras deviennent désordonnées avec des conformations gauches.

La température de transition des lipides est fonction du type de lipides (PC, PS, PI,...) de la longueur des chaînes d'acides gras et du degré de saturation des chaînes d'acides gras. Les lipides que nous avons utilisés proviennent de source naturelle, et sont des mélanges qui contiennent des chaînes d'acides gras de longueur et de saturation variées. Les interactions protéine-lipides peuvent être différentes si le lipide est à l'état fluide ou à

l'état rigide. En général, de tels mélanges n'ont pas une température de transition précise, mais plutôt une zone de transition où les lipides passent progressivement de l'état rigide à l'état fluide. Il faut donc se demander si lors de nos expériences, les chaînes d'acides gras des lipides étaient sous forme fluide ou rigide.

Les expériences ont été faites à température de la pièce. Compte tenu de la température de transition des lipides, donnée dans la littérature soit entre  $-7$  et  $-15^{\circ}\text{C}$  pour PC et entre  $30$  à  $50^{\circ}\text{C}$  pour PG et PI, nous avons peut-être fait certaines expériences où certains lipides étaient sous forme cristalline. Si c'est le cas, les interactions hydrophobes protéines-lipides ont été moins favorisées. Mais cette éventualité est peu probable car les liposomes constitués uniquement de PC, qui ont des températures de transition entre  $-7$  et  $-15^{\circ}\text{C}$ , nous ont donné les mêmes résultats que les autres lipides PI, PG et PS.

Il faut aussi souligner que certains lipides, lorsqu'ils sont sous leur température de transition ont tendance à s'assembler dans certaines régions de la bicouche. Si ce phénomène s'est produit au cours de nos expériences, ceci peut expliquer pourquoi la tête polaire du lipide n'affecte pas l'interaction actine-lipides. En effet, nos liposomes étaient composés seulement de 10% d'un lipide et 90% de PC. Si ce 10% de lipides s'est localisé dans certaines régions de la bicouche, il se peut que l'actine n'ait pas interagi avec cette partie de la bicouche et mais se soit liée seulement avec PC.

Nous avons souligné, l'influence de la température de transition sur les lipides, car quelques auteurs ont montré qu'il n'existait une interaction entre certaines protéines et les lipides seulement à la température de transition. C'est notamment le résultat des travaux de Okimasu et coll. (112, 113, 163) qui ont montré que certaines protéines du cytosquelette, entre autre l'actine, s'associaient au DPPC seulement à la température de transition. Ils concluent qu'une telle interaction ne se produit pas dans les cellules qui sont en général à une température différente de la température de transition du DPPC.

Nos résultats montrent que, contrairement aux travaux d'Okimasu et coll., il existe une interaction directe avec l'actine et les lipides, au-dessus de la température de transition des lipides, soit  $-7$  à  $-15^{\circ}\text{C}$  pour la PC.

### Reproductibilité des résultats

Les résultats que nous avons obtenus sont très reproductibles, cependant, les valeurs expérimentales sont assez variables d'une expérience à l'autre. Le principal facteur qui explique cette variabilité des mesures est le fait que les préparations de liposomes ne sont jamais identiques en taille et en concentration d'une fois à l'autre. En effet, la sonde à ultra-sons utilisée lors de la sonication ne peut être parfaitement contrôlée. De plus, lors de la centrifugation des liposomes, immédiatement après la sonication pour

éliminer les particules de titane provenant de la sonde ainsi que les MLV résiduelles, les culots étaient de grosseurs variables et par conséquent, la concentration de lipides n'étaient pas toujours la même. Il s'agit là de facteurs non contrôlables inhérents à la technique elle-même.

Les expériences ont été refaites à plusieurs reprises quoique les valeurs expérimentales soient variables, les phénomènes observés ont toujours été reproductibles. Les valeurs obtenues varient, mais l'aspect général des courbes est toujours la même.

#### Quel peut être le mécanisme d'interaction entre l'actine et les lipides membranaires ?

Papahadjopoulos et coll. ont défini trois types d'interaction protéines-lipides (Voir figure 56) (121):

- 1) interaction de nature électrostatique par adsorption des protéines à la surface des lipides. Cette interaction produit une faible augmentation de la perméabilité des liposomes.
- 2) interaction électrostatique accompagnée d'une pénétration partielle et d'une légère désorganisation locale des chaînes acyls. Il se produit, dans ce cas, une augmentation de la perméabilité des liposomes.

3) interaction de nature hydrophobe avec entrée complète (figure 3a ou partielle (figure 3b) de la protéine dans la bicouche des lipides. Il en résulte une grande augmentation de la perméabilité des liposomes.

Même si les termes faible et grande perméabilité ne sont pas clairement définis par ces auteurs, compte tenu de l'ensemble de nos résultats, il nous paraît probable que l'interaction actine-liposomes soit le deuxième type d'interaction décrit par Papahadjopoulos soit une interaction électrostatique accompagnée d'une pénétration partielle de la protéine dans la bicouche.

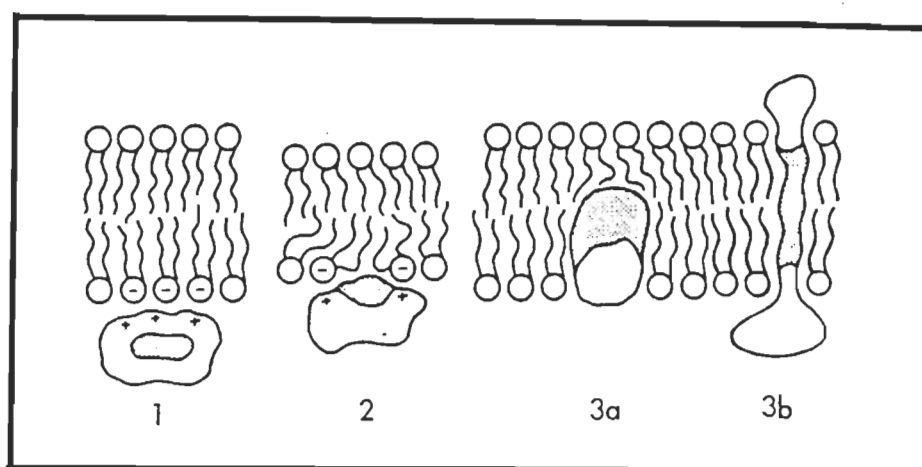


Figure 56: Représentation schématisée des trois types d'interaction protéine-lipides. (121)

Kimelberg et Papahadjopoulos (81) ont suggéré qu'une augmentation de perméabilité d'une membrane provoquée par l'interaction avec une protéine résulte d'une interaction non-polaire entre la protéine et les lipides et implique une entrée de la protéine dans la bicouche avec modification de

l'arrangement des chaînes d'acides gras. Papahadjopoulos et coll. (121) apportent des précisions à cette interprétation, qui se situent au niveau du degré de pénétration de la protéine dans la bicouche et de la désorganisation de l'arrangement des chaînes d'acides gras. Selon ces auteurs, le degré de pénétration, donc de l'association non-polaire d'une protéine avec les lipides, dépend de la fluidité de la membrane. Par exemple la protéine A-1 (protéine basique de la myéline) est expulsée de la bicouche si la température devient inférieure à la température de transition des lipides ou si la membrane est rigidifiée par le cholestérol. Plus la bicouche est fluide, plus la protéine pénètre dans la bicouche. Dans notre système actine-lipides, nous suggérons que l'actine forme des liens non-polaires en s'associant aux chaînes d'acides gras des lipides à un niveau supérieur, près de la tête polaire. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la perméabilité des liposomes en présence d'actine.

Toujours selon Papahadjopoulos et coll. (121), l'entrée d'une protéine dans la membrane ne cause pas nécessairement une désorganisation des chaînes acyls de la bicouche en entier. Ainsi l'apoprotéine N-2 (apoprotéine majeure de la myéline) est au moins partiellement incluse dans la bicouche et réagit seulement avec un nombre limité de phospholipides sans perturber le reste de la bicouche. Nos études de polarisation de fluorescence peuvent nous amener à une interprétation similaire. Aucun changement du degré de polarisation n'est observé en absence de cations divalents. Ainsi l'actine, en entrant très partiellement dans la bicouche, ne perturbe pas les chaînes aliphatiques des lipides. Une conclusion similaire a été apportée par Feinstein et coll. (50).

Ces auteurs n'observent pas d'effet sur la mobilité de la sonde fluorescente incluse dans une bicouche lipidique en présence de cytochrome  $b_5$ . Par contre, en présence de cations divalents, l'actine en polymérisant ou paracristallisant pourrait s'incruster plus fortement dans la bicouche et causer perturbation au niveau des chaînes d'acides gras où se situe la sonde fluorescente.

L'absence de changement de la fluorescence intrinsèque de l'actine pourrait aussi confirmer la faible interaction hydrophobe qui se produit entre l'actine et les liposomes. La variation de l'intensité de fluorescence des résidus tyrosine et tryptophane endogènes est liée à la diminution de la polarité dans l'environnement de ces résidus aminés. Ceci peut s'expliquer soit par une interaction directe du résidu avec la partie hydrophobe des phospholipides et/ou par un changement conformationnel de la protéine. Or dans l'actine ces acides aminés sont probablement situés profondément au centre de la protéine et une interaction directe entre le tryptophane et les phospholipides devient alors impossible.

Nous pouvons donc envisager deux types d'interactions entre l'actine et les liposomes: une interaction de nature électrostatique et une interaction de nature hydrophobe.

### Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature

Certains auteurs dont Okimasu et coll. (112, 113), Utsumi et coll. (163, 164) ont étudié l'interaction de quelques protéines cytoplasmiques, entre autres l'actine, avec des lipides synthétiques dont le DPPC. Ils ont montré, d'une part, qu'il existe une interaction directe actine-lipides seulement à la température de transition. De plus, ces auteurs ont montré que la présence de cholestérol a pour effet d'inhiber l'association de l'actine aux lipides. Leurs résultats entrent en contradiction avec les nôtres puisque nous avons montré, par plusieurs techniques, qu'il se produit une interaction de l'actine avec les lipides membranaires même s'il y a présence de cholestérol et à des températures différentes de la température de transition. Contrairement à ces auteurs, nous avons aussi remarqué que l'actine-G et l'actine-F interagissent avec les liposomes, tandis qu'ils soutiennent que l'actine-F, mais non l'actine-G, s'associe sélectivement aux lipides. Nous avons même observé que les interactions étaient plus marquées en présence d'actine-G qu'en présence d'actine-F.

Ces auteurs arrivent donc à la conclusion qu'une interaction directe entre l'actine et les lipides ne peut exister *in vivo*. Nos résultats semblent indiquer le contraire car les conditions expérimentales que nous avons utilisé ne sont pas incompatibles avec le milieu cellulaire. Il est donc possible que ce type d'interaction puisse se produire dans les systèmes biologiques.



### Possibilité d'une implication biologique de l'interaction actine-lipides membranaires

L'étape initiale de l'activation d'une cellule par un ligand est sa liaison avec des récepteurs spécifiques, à la surface de la membrane (163). Par la suite, le ligand est redistribué et génère un signal transmembranaire. Il a été proposé que des protéines transmembranaires en interaction avec le cytosquelette peuvent modifier ou influencer les propriétés des récepteurs. Ainsi, l'interaction directe de l'actine avec les lipides de la membrane pourrait influencer sur la mobilité des protéines, limitant ainsi certains phénomènes biologiques.

L'actine a deux rôles principaux: un rôle dans le maintien de la forme des cellules, et un autre dans les phénomènes de motilité. Les interactions que nous avons observées peuvent être assez importantes pour lier certains organites. Il se peut aussi que, dans certaines circonstances, une augmentation locale d'ions divalents permette à l'actine de se lier aux lipides et de maintenir l'organite en place. Ces interactions seraient donc impliquées dans la fonction cytosquelette de l'actine. Il est cependant improbable qu'une interaction directe puisse intervenir dans la plupart des processus motiles car les liaisons actine-membrane ne seraient pas assez fortes pour contribuer à des phénomènes de motilité.

D'autre part, il a été montré que l'actine subit une acylation par l'acide palmitique chez *Dictiostelium discoideum*. Cette acylation doit augmenter

l'hydrophobicité de l'actine et, par conséquent, permettre de plus fortes interactions avec la membrane.

Il faut souligner que, dans la cellule, deux types de liaison de l'actine aux membranes ont été identifiés. De Couet et coll. (38) et autres (37, 45) ont montré qu'une partie de l'actine présente dans les cellules des écrevisses *Cherax destructor* était fortement liée à la membrane. Le reste est faiblement lié et peut être facilement dissocié de la membrane. Ces auteurs présument que l'actine fortement liée est attachée à une ou plusieurs protéines intégrales de la membrane. Ils n'ont cependant rien proposé quant au mode d'attachement de l'actine faiblement liée. Nous suggérons que cette actine pourrait être liée directement aux lipides.

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent qu'il peut se produire une interaction directe entre l'actine et les lipides dans les cellules. Nous avons montré qu'une interaction hydrophobe a lieu en absence de cations divalents et aussi qu'une interaction électrostatique se produit en présence d'environ 10 mM d'ions divalents. Dans un article, Fulton (55) mentionne que la cellule en général peut contenir jusqu'à 8 mM d'ions  $Mg^{2+}$ . Ainsi nos conditions expérimentales sont compatibles avec les conditions cellulaires et une interaction directe actine-lipides nous paraît possible *in vivo*.

Il est généralement admis dans la littérature que l'actine est liée aux membranes par l'intermédiaire d'autres protéines. Notre étude montre qu'un

autre type d'interaction peut se produire c'est-à-dire une interaction directe sans les protéines membranaires liant l'actine. Cette interaction directe actine-lipides n'est pas incompatible avec les conditions cellulaires puisque nous avons montré que cette interaction est possible avec des lipides membranaires, à des températures supérieures aux températures de transition des lipides, dans des conditions de force ionique retrouvées dans les cellules. Il est de ce fait probable qu'une telle interaction directe actine-lipides se produisent *in vivo* et participe à certains phénomènes biologiques comme le maintien d'organites dans les cellules.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Allen, N.S.: Endoplasmic filaments generate the motive force for rotational streaming in *Nitella*. J. Cell Biol., 63: 270-287 (1974).
2. Andrews, P.M.; Bates, S.B.: Filamentous actin bundles in the kidney. The Anatomical Record, 210: 1-9 (1984).
3. Asakura, S.; Hotta, K.; Imai, N.; Ooi, T.; Oosawa, T.: Transformation of actin by divalent cations. Conference on the chemistry of muscular contraction, 53, Igaku Shoin, Ltd, Tokyo, 1958.
4. Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol., 13: 238-252 (1965).
5. Barany, M.; Biro, N.A.; Molnar, J.: The reaction between actin and divalent cations. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 5: 63-78 (1954).
6. Barber, B.H.; Crumpton, M.J.: Actin associated with purified lymphocyte plasma membrane. FEBS-lett., 66: 215-220 (1976).
7. Barden, J.A.; Dos Remedios, C.G.: The environment of the high-affinity cation binding site on actin and the separation between cation and ATP sites as revealed by proton NMR and fluorescence spectroscopy. J. Biochem., 96: 913-921 (1984).
8. Barden, J.A.; Curmi, P.M.G.; Dos Remedios, C.G.: Crystalline actin tubes. The effect of the  $\text{Th}^{4+}$  on actin and the role of ionic charge in tube formation. J. Biochem., 92: 1319-1323 (1982).
9. Barden, J.A.; Curmi, P.M.G.; Dos Remedios, C.G.: Crystalline actin tubes. The interaction of scandium and yttrium with skeletal muscle actin. Biochim. Biophys. Acta, 671: 25-32 (1981).

10. Begg, D.A.; Rodewald, R.; Rebhun, L.J.: The visualization of actin filament polarity in thin section. *J. Cell Biol.*, 79: 846-852 (1978).
11. Bennett, V.: The molecular basis for membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes. *J. Cell Biochem.*, 18: 49-65 (1982).
12. Ben-Ze'ev, A.: The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 780: 197-212 (1985).
13. Blest, A.D.; de Couet, H.G.: Actin in the basement membrane of the compound eye of a blowfly. *Cell Tissue Res.*, 231: 325-336 (1983).
14. Blikstad, I.; Carlsson, L.: On the dynamics of the microfilament system in Hela cells. *J. Cell Biol.*, 93: 122-128 (1982).
15. Blitz, A.L.; Fine, R.E.: Muscle-like contractile proteins and tubulin in synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 4472-4476 (1974).
16. Boschek, C.R.; Jockusch, B.M.; Friis, R.R.; Back, R.; Grundmann, E.; Bauer, H.: Early changes in the distribution and organization of microfilament proteins during cell transformation. *Cell*, 24: 175-184 (1981).
17. Boxer, L.A.; Hedley-Whit, E.T.; Stossel, T.P.: Neutrophil actin dysfunction and abnormal neutrophil behavior. *N. Engl. J. Med.*, 291: 1093-1099 (1974).
18. Bradley, R.H.; Ireland, M.; Maisel, H.: The cytoskeleton of chick lens cells. *Exp. Eye Res.*, 28: 441-453 (1979).
19. Bradley, M.O.: Microfilament and cytoplasmic streaming: Inhibition of streaming by cytochalasin. *J. Cell Sci.*, 12: 327-334 (1973).
20. Branton, D.; Cohen, C.C.; Tyler, J.: Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell*, 24: 24-32 (1981).
21. Bretscher, A.: Molecular architecture of the microvillus cytoskeleton. In: *Brush Border membranes*, Pitman books Ltd, London (Ciba Foundation symposium) 95, 164-179 (1983).

22. Burridge, K.; Kelly, T.; Connell, I.: Proteins involved in the attachment of actin to the plasma membrane. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. [Biol]*, 299: 291-299 (1982).
23. Burridge, K.; Phillips, J.H.: Association of actin and myosin with secretory granule membranes. *Nature*, 254: 526-529 (1975).
24. Burn, P.; Rotman, A.; Meyer, R.K.; Burger, M.M.: Diacylglycerol in large  $\alpha$ -actinin/actin complexes and in the cytoskeleton of activated platelets. *Nature*, 314: 469-472 (1985).
25. Chang, C.M.; Goldman, R.D.: The localization of actin-like fibers in cultured neuroblastoma cells as revealed by heavy meromyosin binding. *J. Cell Biol.*, 57: 867-874 (1973).
26. Chapman, D.; Gomez-Fernandez, J.C.; Goni, F.M.: Intrinsic protein-lipid interactions. Physical and biochemical evidence. *FEBS-lett.*, 98: 211-223 (1979).
27. Chapman, D.: Physical studies of phospholipids and biological membranes: In: *Biological membranes*, Colbow, K. and Simon Fraser University Eds, B.C., Canada, pp. 3-137 (1975).
28. Clarke, M.; Schatten, G.; Mazia, D.; Spudich, J.A.: Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 1758-1762 (1975).
29. Clarke, M.: Isolation and characterization of a water-soluble protein from bovine erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 45: 1063-1071 (1971).
30. Cohen, C.M.; Tyler, J.M.; Branton, D.: Spectrin-actin associations studied by electron microscopy of shadowed preparations. *Cell*, 21: 875-883 (1980).

31. Cohen, J.C.M.; Jackson, P.L.; Branton, D.: Actin-membrane interactions: Association of G-actin with the red cell membrane. *J. Supramol. Struct.*, 9: 113-124 (1978).
32. Collins, J.H.; Borysenko, C.W.: The 110,000 -dalton actin- and calmodulin-binding protein from intestinal brush border is a myosin-like ATPase. *J. Cell Biol.*, 259: 4128-4135 (1984).
33. Comley, L.T.: Microfilaments in *Chaos carolinensis*. Membrane association, distribution, and heavy meromyosin binding in the glycerinated cells. *J. Cell Biol.*, 58: 230-237 (1973).
34. Condeelis, J.S.: Reciprocal interaction between the actin lattice and cell membrane. *Neurosciences Res. Prog. Bull.*, 19: 83-101 (1981).
35. Condeelis, J.S.; Taylor, D.L.: The contractile basis of amoeboid movement. The control of gelation, solation and contraction in extracts from *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.*, 74: 901-927 (1977).
36. Cox, G.; Juniper, B.E.: High-voltage electron microscopy of whole, critical point dried plant cells-fine cytoskeletal elements in the moss *Bryum tenuisetum*. *Protoplasma*, 115: 70-80 (1983).
37. Davies, G.E.: Association of actin with the platelet membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 772: 149-160 (1984).
38. De Couet, H.G.; Stowe, S.; Blest, A.D.: Membrane associated actin in the rhabdomeral microvilli of crayfish photoreceptors. *J. Cell Biol.*, 98: 834-846 (1984).
39. Del Vecchio, P.I.; Mac Elroy, K.S.; Rosser, M.P.; Chruch, R.L.: Association of  $\alpha$ -crystallin with actin in cultured lens cells. *Current Eye Research*, 3: 1213-1219 (1984).
40. De Rosier, D.J.; Tilney, L.G.: The form and function of actin: a product of its unique design. *Cell and Muscle Motility*, 5: 139-169 (1984).

41. Devaux, P.F.; Seigneuret, M.: Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic techniques. *Biochim. Biophys. Acta*, 822: 63-125 (1985).
42. Dos Remedios, C.G.; Dickens, M.J.: Actin microcrystals and tubes formed in the presence of gadolinium ions. *Nature*, 276: 731-733 (1978).
43. Dufourcq, J.; Faucon, J.F.: Specific binding of a cardiotoxin from *Naja mossambica mossambica* to charged phospholipids detected by intrinsic fluorescence. *Biochemistry*, 17: 1170-1176 (1978).
44. Dufourcq, J.; Faucon, J.F.: Intrinsic fluorescence study of lipid-protein interactions in membrane models. Binding of mellitin, an amphipatic peptide, to phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 467: 1-11 (1976).
45. Dufourcq, J.; Faucon, J.F.; Lussan, C.; Bernon, R.: Study of lipid-protein interactions in membrane models: intrinsic fluorescence of cytochrome b<sub>5</sub>-phospholipid complexes. *FEBS-lett.* 57: 112-116 (1975).
46. Eaton, J.W.: The red cell: A primer. In: *Erythrocyte membranes 2: Recent clinical and experimental advances.*, Alan, R. Liss, Inc., N.Y., p. 1-4 (1981).
47. Eckert, B.S.; McFee-Russel, S.M.: The patterned organization of thick and thin microfilaments in the contracting pseudopod of *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.*, 13: 727-739 (1973).
48. Faucon, J.F.; Dufourcq, J.; Couraud, F.; Rochat, H.: Lipid-protein interactions. A comparative study of the binding of cardiotoxins and neurotoxins to phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 554: 332-339 (1979).
49. Faucon, J.F.; Dufourcq, J.; Lussan, C.; Bernon, R.: Lipid protein interaction in membrane models. Fluorescence polarization study of cytochrome b<sub>5</sub>-phospholipids complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 436: 283-294 (1976).



50. Feinstein, M.P.; Fernandez, S.M.; Sha'afi, R.: Fluidity of natural membranes and phosphatidylserine and ganglioside dispersions. Effects of local anesthetics, cholesterol and protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 413: 354-370 (1975).
51. Forer, A.: Does actin produce the force that moves a chromosome to the pole during anaphase? *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 63: 585-598 (1985).
52. Forer, A.; Behnke, O.: An actin-like component in sperm tails of a crane fly (*Nephrotoma suturalis* Loew). *J. Cell Sci.*, 11: 491-519 (1972).
53. Fowler, V.; Luna, E.J.; Hargreaves, W.R.; Taylor, D.L.; Branton, D.: Spectrin promotes the association of F-actin with the cytoplasmic surface of the human erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.*, 88: 388-395 (1981).
54. Frieden, C.: Polymerization of actin: Mechanism of the  $Mg^{2+}$ -induced process at pH 8 and 20°C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 6513-6517 (1983).
55. Fulton, A.B.: Treadmilling, diffusional exchange and cytoplasmic structures. *J. Muscle Res. and Cell Motility*, 6: 263-273 (1985).
56. Geiger, B.: Membrane-cytoskeleton interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 737: 305-341 (1983).
57. Geiger, B.: A 130k protein from chicken gizzard: Its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*, 18: 193-205 (1979).
58. Georgiou, S.; Thompson, M.; Mukhopadhyay, A.K.: Melittin-phospholipid interactions studied by employing the single tryptophan residue as an intrinsic fluorescent probe. *Biochim. Biophys. Acta*, 688: 441-452 (1982).
59. Glenny, J.R. jr; Osborn, M.; Weber, K.: The intracellular localization of the microvillus 110K protein, a component considered to be involved in

- side-on membrane attachment of F-actin. *Exp. Cell Res.*, 138: 199-205 (1982).
60. Goldman, R.D.; Yerna, M.J.; Schloss, J.A.: Localization and organization of microfilaments and related proteins in normal and virus-transformed cells. *J. Supramol. Struct.*, 5: 155-183 (1976).
61. Goodloe-Holland, C.M.; Luna, E.J.: A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum*. III. Plasma membrane fragments bind predominantly to the sides of actin filaments. *J. Cell Biol.* 99: 71-78 (1984).
62. Gershman, L.C.; Estes, J.E.; Selden, L.A.: Actin polymerization is regulated by the tightly bound divalent cation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 435: 151-153 (1984).
63. Grazi, E.; Trombetta, G.: Effects of temperature on actin polymerized by  $\text{Ca}^{2+}$ . Direct evidence of fragmentation. *Biochem. J.*, 232: 297-300 (1985).
64. Grazi, E.; Aleotti, A.; Ferri, A.: Characterization of the ATP-G-actin aggregates formed at low potassium chloride concentration. *Biochem. J.*, 219: 273-276 (1984).
65. Gruenstein, E.; Wickus, G.; Rich, A.: Membrane associated actin decrease following the transformation of chick embryo fibroblasts. *Biophys. J.*, 15: 160 abstr. (1975).
66. Gruenstein, E.; Rich, A.; Weihing, R.R.: Actin associated with plasma membranes from 3T3 and Hela cells. *J. Cell Biol.*, 64: 223-234 (1975).
67. Haest, C.W.: Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 694: 331-352 (1982).
68. Hanson, J. Abstr. 7th. Int. Cong. Biochem. Tokyo, 1976, II-327; Sym. Biol. Hung., 8: 99 (1967).

69. Heacock, C.S.; Bamburg, J.R.: Levels of filaments and globular actin in chinese hamster ovary cells throughout the cell cycle. *Exp. Cell Res.*, 147: 240-246 (1983).
70. Hirokawa, N., Tilney, L.G.: Interactions between actin filaments and between actin filaments and membranes in quick-frozen and deeply etched hair cells of the chick ear. *J. Cell Biol.*, 95: 249-261 (1982).
71. Howe, C.R.; Mooseker, M.S.: Characterization of the 110-kdalton actin-, calmodulin- and membrane-binding protein from microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 97: 974-985 (1983).
72. Howell, S.L.; Tyhurst, M.: Actomyosin interactions with insulin-storage granules *in vitro*. *Biochem. J.*, 206: 157-160 (1982).
73. Ireland, M.; Lieska, N.; Maisel, H.: Lens actin: Purification and localization. *Exp. Cell Res.*, 37: 393-408 (1983).
74. Jain, M.K.; Egmond, M.R.; Verheij, H.M.; Apitz-Castro, R.; Dijkman, R.; De Haas, G.H.: Interaction of phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 688: 341-348 (1982).
75. Jacobson, B.S.: Actin binding to the cytoplasmic surface of the plasma membrane isolated from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 97: 1493-1498 (1980).
76. Jeon, K.W.; Jeon, M.S.: Cytoplasmic filaments and cellular wound healing in *Amoeba proteus*. *J. Cell Biol.*, 67: 243-249 (1975).
77. Jockush, B.M.; Isenberg, G.: Vinculin and  $\gamma$ -actinin: Interaction with actin and effect on microfilament network formation. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, 46: 613-623 (1981).
78. Kane, R.E.: Preparation and purification of polymerized actin from sea urchin egg extracts. *J. Cell Biol.*, 66: 305-315 (1975).
79. Kawamura, M.; Maruyama, K.: Polymorphism of F-actin. I. Three forms of paracrystal. *J. Biochem.* 68: 885-899 (1970).

80. Kibbelaar, M.A.; Seltem-Versteegen, A.E.; Bloemendal, H.; Dunia, I.; Benedetti, E.L.: Actin in mammalian lens. *Eur. J. Biochem.*, 95: 543-549 (1979).
81. Kimelberg, H.K.; Papahadjopoulos, D.: Phospholipid-protein interactions: membrane permeability correlated with monolayer "penetration". *Biochim. Biophys. Acta*, 233: 805-809 (1971).
82. Klausner, R.D.; Kumar, N.; Weinstein, J.N.; Blumenthal, R.; Flavin, M.: Interaction of tubulin with phospholipid vesicles. I. Association with vesicles at the phase transition. *J. Biol. Chem.*, 256: 5879-5885 (1981).
83. Korn, E.D.: Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells. *Physiol. Rev.*, 62: 672-737 (1982).
84. Korn, E.D.; Wright, P.L.: Macromolecular composition of an *Amoeba* plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 248: 439-447 (1973).
85. Kuroda, K.; Manabe, E.: Microtubule-associated cytoplasmic streaming in *Caulerpa*. *Proc. Japan Acad.*, 59: 131-134 (1983).
86. Lehrer, S.S.; Derwar, G.: Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry*, 11: 1211-1216 (1972).
87. Llerenas, E.; Cid, M.E.: The molecular interaction between F-actin and lecithin in a phospholipid monolayer system. *BoI. Estud. Med. Biol. Univ. Mac. Auton mex.*, 33: 33-40 (1985).
88. Luna, E.J.; Goodloe-Holland, C.M.; Ingalls, H.M.: A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum*. II. Integral proteins mediate the binding of plasma membranes to F-actin affinity beads. *J. Cell Biol.*, 99: 58-70 (1984).
89. Luna, E.J.; Fowler, V.M.; Swanson, J.; Branton, D.; Taylor, D.L.: A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum*. I. Identification and partial characterization of an actin-binding activity. *J. Cell Biol.*, 88: 396-409 (1981).

90. Mabuchi, I.; Spudis, J.A.: Purification and properties of soluble actin from sea urchin eggs. *J. Biochem.*, 87: 785-802 (1980).
91. MacLean-Fletcher, S.; Pollard, T.D.: Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell*, 20: 329-341 (1980).
92. Mangeat, P.; Burridge, K.: Actin-membrane interaction in fibroblasts: What proteins are involved in this association? *J. Cell Biol.*, 99: 95-103 (1984).
93. Martonosi, A.; Molino, C.M.; Gergely, J.: The binding of divalent cations to actin. *J. Biol. Chem.*, 239: 1057-1064 (1964).
94. Maruyama, K.; Tsukagoshi, K.: Effects of KCl, MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> concentrations on the monomer-polymer equilibrium of actin in the presence and absence of cytochalasin D. *J. Biochem.*, 96: 605-611 (1984).
95. Maruyama, K.; Tsukagoshi, K.; Mabuchi, I.: Direct visualization of the effect of Mg<sup>2+</sup> on the elongation at the pointed ends of *Limulus* acrosomal actin bundles. *Zoological Science*, 1: 565-574 (1984).
96. Maruyama, M.: Effects of trace amounts of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on the polymerization of actin. *Biochim. Biophys. Acta*, 667: 139-142 (1981).
97. Mc Connell, D.S.; Schullery, S.E.: Phospholipid vesicle fusion and drug loading: temperature, solute and cholesterol effects, and, a rapid preparation for solute-loaded vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 818: 13-22 (1985).
98. Mc Nutt, N.S.: A thin-section and freeze fracture study of microfilament-membrane attachments in choroid plexus and intestinal microvilli. *J. Cell Biol.*, 79: 774-787 (1978).
99. Mehradian, M.; Bame, K.J.; Rome, L.H.: Interaction of rat liver lysosomal membranes with actin. *J. Cell Biol.*, 99: 680-685 (1984).

100. Mesland, D.A.M.; Spiele, H.; Roos, E.: Membrane associated cytoskeleton and coated vesicles in cultured hepatocytes visualized by dry cleaving. *Exp. Cell Res.*, 132: 169-184 (1981).
101. Meyer, D.I.; Burger, M.M.: The chromaffin granule surface: The presence of actin and the nature of its interaction with the membrane. *FEBS-lett.*, 101: 129-133 (1976).
102. Moore, P.B.; Ownby, C.; Carraway, K.L.: Interactions of cytoskeletal elements with the plasma membrane of sarcoma 180 ascites tumor cells. *Exp. Cell Res.*, 115: 331-342 (1978).
103. Moore, P.L.; Bank, H.L.; Brissie, N.T.; Spicer, S.S.: Association of microfilament bundles with lysosomes in polymorphonuclear leucocytes. *J. Cell Biol.*, 71: 659-666 (1976).
104. Miki-Noumura, T.; Oosawa, R.: An actin-like protein of the sea urchin egg. I. Its interaction with myosin from rabbit striated muscle. *Exp. Cell Res.*, 56: 224-232 (1969).
105. Mooseker, M.S.; Tilney, L.G.: The organization of an actin filament-membrane complex: filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 67: 725-743 (1975).
106. Mukherjee, T.M.: The fine structural organization of the brush border of intestinal epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 8: 573-599 (1971).
107. Murray, R.L.; Dubin, M.W.: The occurrence of actin like filaments in association with migrating pigment granules in frog retinal pigment epithelium. *J. Cell Biol.*, 64: 705-710 (1975).
108. Needham, D.M.: *Machina Carnis*. Cambridge University press eds., N.Y., 782 p. (1971).
109. Neuhaus, J.M.; Wanger, M.; Keiser, T.; Wegner, A.: Treadmilling of actin. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 4: 507-527 (1983).

110. Nonomura, Y.; Katayama, E.; Ebasni, S.: Effect of phosphate on the structure of the actin filament. *J. Biochem.*, 78: 1101-1104 (1975).
111. Okamoto, Y.; Komatsu, I.; Kinfo, E.; Sekine, T.: Actin and actin-associated proteins of rabbit liver cell. *J. Biochem.*, 94: 645-653 (1983).
112. Okimasu, E.; Nobori, K.; Kobayashi, S.; Suzaki, E.; Terada, S.; Utsumi, K.: Inhibitory effect of cholesterol on interaction between cytoplasmic actin and liposomes, and restorative effect of high osmotic pressure. *Cell Struct. Funct.*, 12: 187-195 (1987).
113. Okimasu, E.; Fujii, Y.; Utsumi, T.; Yamamoto, M.; Utsumi, K.: Cytoplasmic proteins, association with phospholipid vesicles and its dependency on cholesterol. *Cell Struct. Funct.*, 11: 273-283 (1986).
114. Oosawa, F.; Kasai, M.: Actin. In: Subunits in Biological Systems. Part A.; Timasheff, S.N. and Fasman, G.D. eds.; N.Y. Dekker, 1971, pp. 261-322.
115. Oplatka, A.; Borejo, J.; Gadasi, H.; Muhlead, A.: Inhibition of normal and transformed fibroblast aggregation by skeletal muscle F-actin. *FEBS-lett.*, 63: 267-269 (1976).
116. Ostlund, R.E.; Leung, J.T.; Kipnis, D.M.: Muscle actin filaments bind pituitary secretory granules *in vitro*. *J. Cell Biol.*, 73: 78-87 (1977).
117. Palek, J.; Shih, C.L.: Alterations of spectrin assembly in the red cell membrane: functional consequences. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 41: 131-138 (1981).
118. Palevitz, B.A.; Hepler, P.K.: Identification of actin *in situ* at the ectoplasm-endoplasm interface of *Nitella*. *J. Cell Biol.*, 65: 29-38 (1975).
119. Palevitz, B.A.; Ash, J.F.; Hepler, P.K.: Actin in the green alga *Nitella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 363-366 (1974).

120. Papahadjopoulos, D.; Portis, A.; Pangborn, W.: Calcium-induced lipid phase transitions and membrane fusion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 308: 50-62 (1978).
121. Papahadjopoulos, D.; Moscarello, M.; Eylax, E.H.; Isac, T.: Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 401: 317-335 (1975).
122. Parthasarathy, M.V.; Muhenthaler, K.: Cytoplasmic filaments in plant cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 38: 46-62 (1972)
123. Pinder, J.C.; Ohanian, V.; Gratzer, W.B.: Spectrin and protein 4.1 as an actin filament capping complex. *FEBS-lett.*, 169: 161-164 (1984).
124. Pollard, T. D.; Cooper, J.A.: Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and function. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 987-1035 (1986).
125. Pollard, T.D.; Korn, E.D.: Electron microscope identification of actin associated with isolated amoeba plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 248: 448-450 (1973).
126. Pontremoli, S.; Melloni, E.; Sparatore, B.; Salamino, R.; Michetti, M.; Sacco, O.; Horecker, B.L.: Binding to erythrocyte membrane is the physiological mechanism for activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 128: 331-338 (1985).
127. Rogalski, A.A.; Singer, S.J.: An integral glycoprotein associated with the membrane attachment sites of actin microfilaments. *J. Cell Biol.*, 101: 785-801 (1985).
128. Rohman, A.: Receptor and non-receptor-mediated activation of blood platelets. Effect on membrane-cytoskeleton interaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 120: 898-906 (1984).



129. Roustan, C.; Benyamin, Y.; Boyer, M.; Bertrand, R.; Audenard, E.; Jauregui-Adell, J.: Conformational changes induced by  $Mg^{2+}$  on actin monomers. *FEBS-lett.*, 181: 119-123 (1985).
130. Saibil, H.R.: Actin in squid retinal photoreceptors. *J. Physiol.*, 28: 17 (1978).
131. Sanders, S.K.; Craig, S.W.: A lymphocyte cell surface molecule that is antigenically related to actin. *J. Immunol.*, 131: 370-377 (1983).
132. Schollmeyer, J.V.; Goll, D.E.; Tilney, L.; Mooseker, M.; Robson, R.; Stromer, M.: Localization of  $\alpha$ -actinin in non-muscle material. *J. Cell Biol.*, 63: 304a (abstr.) (1974).
133. Schroeder, T.E.: Actin in dividing cells: Contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 1688-1692 (1973).
134. Selden, L.A.; Esters, J.E.; Gershman, L.C.: The tightly bound divalent cation regulates actin polymerization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 116: 478-485 (1983).
135. Sheetz, M.P.; Painter, R.G.; Singer, S.J.: The contractile proteins of erythrocyte membranes and erythrocyte shape changes. In: *Cell Motility* Goldman, R.; Pollard, T.; Rosenbaum, J. Eds. Cold Spring Harbor Lab., vol. B., pp. 651-664 (1976).
136. Shinitzky, M.; Barenholz, Y.: Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate. *J. Biol. Chem.*, 249: 2652-2657 (1974).
137. Shinitzky, M.; Dianoux, A.C.; Gitler, C.; Weber, G.: Microviscosity and order in the hydrocarbon region of micelles and membranes determined with fluorescent probes. I. Synthetic micelles. *Biochemistry*, 10: 2106-2113 (1971).
138. Small, J.V.; Celis, J.E.: Filaments arrangements in negatively stained cultured cells: The organization of actin. *Cytobiology*, 16: 308-325 (1978).

139. Small, J.V.; Isenberg, G.; Celis, J.E.: Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature*, 272: 638-639 (1978).
140. Smith, P.R.: Towards an alignment of the actin molecule within the actin filament. *Ultramicroscopy*, 13: 113-123 (1984).
141. Smith, P.R.; Fowler, W.E.; Pollard, T.D.; Aebi, U.: Structure of the actin molecule determined from electron micrographs of crystalline actin sheets with a tentative alignment of the molecule in the actin filament. *J. Mol. Biol.*, 167: 641-660 (1983).
142. Snoek, G.t.; Rosenberg, I.; De Laat, S.W.; Gitter, C.: The interaction of protein kinase C and other specific cytoplasmic proteins with phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 860: 336-344 (1986).
143. Spudich, J.A.: Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. II. Purification, properties, and membrane association of actin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.*, 249: 6013-6020 (1974).
144. Spudich, J.A.; Watt, S.: The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.*, 246: 4866-4871 (1971).
145. St-Onge, D.: Etudes de l'interaction entre l'actine et les lipides. Thèse de maîtrise en Biophysique. UQTR. (1986)
146. Straub, F., Feuer, G.: Adenosine triphosphate the fonctionnal group of actin. *Biochim. Biophys. Acta*, 4: 455-470 (1950).
147. Stromer, M.H.; Boll, D.E.; Roth, L.E.: Morphology of rigor-shortened bovine muscle and the effect of trypsin on pre- and postrigor myofibril. *J. Cell Biol.*, 34: 431-445 (1967).
148. Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewicz, E.; Drabikowski, W.: Interaction of actin with divalent cations. Characterization of protein-metal complexes. *Eur. J. Biochem.*, 88: 229-237 (1978).

149. Szoka, F.; Papahadjopoulos, D.: Procedures for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 4194-4198 (1978).
150. Talbot, J.C.; Lalanne, J.; Faucon, J.F.; Dufourcq, J.: Effect of the state of association of melittin and phospholipids on their reciprocal binding. *Biochim. Biophys. Acta*, 689: 1106-1112 (1982).
151. Taylor, D.G.; Williams, V.M.; Crawford, N.: Platelet membrane actin: solubility and binding studies with <sup>125</sup>I-labelled actin. *Biochem. Soc. Trans.*, 4: 156-160 (1976).
152. Taylor, D.L.; Condeelis, J.S.; Moore, P.L.; Allen, R.D.: The contractile basis of amoeboid movement. *J. Cell Biol.*, 59: 378-394 (1973).
153. Tellam, R.: Mechanism of CaCl<sub>2</sub>-induced actin polymerization. *Biochemistry*, 24: 4455-4460 (1985).
154. Tilney, L.G.; Jaffe, L.A.: Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. *J. Cell Biol.*, 87: 771-782 (1980).
155. Tilney, L.G.; Mooseker, M.S.: Actin filament-membrane attachment: Are membrane particles involved? *J. Cell Biol.*, 71: 402-416 (1976).
156. Tilney, L.G.: The polymerization of actin. II. How non-filamentous actin becomes non randomly distributed in sperms: evidence for the association of this actin with membranes. *J. Cell Biol.*, 69: 51-72 (1976).
157. Tilney, L.G.; Dermers, P.: Actin in erythrocytes ghosts and its association with spectrin. *J. Cell Biol.*, 66: 508-520 (1975).
158. Tilney, L.G.: Actin filaments in the acrosomal reaction of *Limulus* sperm motion generated by alterations in the packing of filaments. *J. Cell Biol.*, 64: 289-310 (1975).

159. Tobacman, L.; Korn, E.D.: The kinetics of actin nucleation and polymerization. *J. Biol. Chem.*, 258: 3207-3214 (1983).
160. Traas, J.A.: Visualization of the membrane bound cytoskeleton and coated pits of plant cells by means of dry cleaving. *Protoplasma*, 119: 212-218 (1984).
161. Tsilibary, E.C.; Williams, M.C.: Actin and secretion of surfactant. *J. Histochem. Cytochem.*, 31: 1298-1304 (1983).
162. Utsumi, K.; Sato, E.; Okimasu, E.; Miyahara, M.; Takahashi, R.: Calcium-dependent association of 33 kDa protein in polymorphonuclear leukocytes with phospholipid liposomes containing phosphatidylserine or cardiolipin. *FEBS-lett.*, 201: 277-281 (1986).
163. Utsumi, K.; Okimasu, E.; Morimoto, Y.M.; Nishihara, Y.; Miyahara, M.: Selective interaction of cytoskeletal proteins with liposomes. *FEBS-lett.* 141: 176-180 (1982).
164. Utsumi, K.; Okimasu, E.; Takehara, Y.; Watanabe, S.; Miyahara, M.; Moromizato, Y.: Interaction of cytoplasmic proteins with liposomes and their cell specificity. *FEBS-lett.* 124: 257-260 (1981).
165. Vandekerckhove, J.; Weger, K.: At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.*, 126: 783-802 (1978).
166. Van Eldik, L.J.; Zendigui, J.G.; Marshak, D.R.; Watterson, D.M.: Calcium-binding proteins and the molecular basis of calcium action. *Int. Rev. Cytol.*, 77: 1-61 (1982).
167. Vaz, W.L.C.; Vogel, H.; Jahmig, F.; Austin, R.H.: Kinetics of the incorporation of cytochrome b<sub>5</sub>, an integral membrane protein, into unilamellar dimyristoyllecithin liposomes. *FEBS-lett.*, 87: 269-272 (1978).

168. Vincent, J.P.; Valerna, M.; Lazdunski, M.: Properties of association of cardiotoxins with lipid vesicles and natural membranes. A fluorescence study. FEBS-Lett., 85: 103-108 (1978).
169. Wangner, M.; Wegner, A.: Similar affinities of ADP and ATP for G-actin at physiological salt concentrations. FEBS-lett., 162: 112-116 (1983).
170. Walker, J.H.; Boustead, C.M.; Witzemann, V.: The 43-k protein,  $\nu_1$ , associated with acetylcholine receptor containing membrane fragments is an actin-binding protein. EMBO J., 3: 2287-2290 (1984).
171. Wegner, A.: Treadmilling of actin at physiological salt concentrations: an analysis of the critical concentrations of actin filaments. J. Mol. Biol., 161: 607-615 (1982).
172. Weihing, R.R.; Korn, E.D.: *Acanthamoeba* actin: composition of the peptide that contains 3- methylhistidine and a peptide that contains N -methyllysine. Biochemistry, 11: 1538-1543 (1972).
173. Weinstein, J.N.; Blumenthal, R.; Klausner, R.D.: Carboxyfluorescein leakage assay for lipoprotein-liposome interaction. Methods in Enzymology, 128: 657-668 (1986).
174. Weissman, G.; Claiborne, R. In: Cell membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology. G. Weissman and R. Claiborne Eds. N.Y., 1975, 283p.
175. Wickus, G.; Grenstein, E.; Robbins, P.W.; Rich, A.: Decrease in membrane associated actin of fibroblasts after transformation by Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 746-749 (1975).
176. Winegrad, S.: Regulation of cardiac contractile proteins-correlation between physiology and biochemistry. Circulation Research, 55: 565-574 (1984).

177. Wohlman, A.; Allen, R.D.: Structural organization associated with pseudopod extension and contraction during cell locomotion in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.*, 3: 105-114 (1968).
178. Wolf, M.P.; Cuatrecasas, P.; Sahyoun, N.: Interaction of protein kinase C with membranes is regulated by  $\text{Ca}^{2+}$ , phorbol esters, and ATP. *J. Biol. Chem.*, 260: 15718-15722 (1985).
179. Wong, M.; Anthony, F.H.; Tillack, T.W.; Thompson, T.E.: Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles at 4°C. *Biochemistry*, 21: 4126-4132 (1982).